

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 septembre 2003 (04.09.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/072787 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/62, C07K 14/715, G01N 33/50

(74) Mandataire : **BOUVET, Philippe**; AVENTIS PHARMA
S.A., Direction Brevets, 20 Avenue Raymond Aron,
F-92165 ANTONY CEDEX (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/00610

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :
25 février 2003 (25.02.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/02431 26 février 2002 (26.02.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants : AVENTIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20
Avenue Raymond Aron, F-92160 ANTONY (FR). IN-
STITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101 rue de
Tolbiac, F-75654 PARIS CEDEX 13 (FR). CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
[FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75794 PARIS CEDEX 16
(FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

(72) Inventeurs: **JOCKERS, Ralph**; 94 rue de Gometz,
F-91440 BURES SUR YVETTE (FR). **COUTURIER,**
Cyril; 17 rue Bénard, F-75014 PARIS (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR DETECTION OF LEPTIN RECEPTOR LIGANDS

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION DE LIGANDS DU RECEPTEUR DE LA LEPTINE

(57) Abstract: The invention relates to a method for detection of leptin receptor ligands as a function of the transfer of energy between fusion proteins comprising leptin receptors and energy-donor and -acceptor proteins. The invention further relates to fusion proteins for application in said method.

(57) Abrégé : La présente demande a pour objet un procédé de détection de ligands du récepteur de la leptine par mesure du transfert d'énergie entre des protéines de fusion composées de récepteurs de la leptine, et de protéines donneurs et accepteurs d'énergie. Elle est en outre relative à des protéines de fusion pour la mise en oeuvre de ce procédé.

WO 03/072787 A2

PROCEDE DE DETECTION DE LIGANDS DU RECEPTEUR DE LA LEPTINE

La présente invention est relative à un procédé de détection de ligands du récepteur de la leptine par mise en œuvre du transfert d'énergie entre des protéines de fusion
5 composées de récepteurs de la leptine et de protéines donneurs ou accepteurs d'énergie.

Elle est en outre relative à des protéines de fusion pour la mise en œuvre de ce procédé.

10 La leptine est une protéine présentant un poids moléculaire de 16 kDa qui est sécrétée par les adipocytes. Cette protéine est associée à la sensation de satiété, et joue un rôle majeur dans le contrôle de la prise de poids, la consommation d'énergie, la formation osseuse, l'angiogénèse mais aussi dans d'autres fonctions physiologiques telles que le déclenchement de la puberté et le contrôle de la reproduction ou la régulation de la
15 réponse immunitaire régulée par les lymphocytes T.

Le récepteur de la leptine (OBR) appartient à la famille des récepteurs aux cytokines. Il est composé, comme l'illustre la figure 1 d'une chaîne polypeptidique unique comprenant un domaine transmembranaire (Tartaglia et al., J. Biol. Chem, 272, 6093-6096, 1995). La demande de brevet WO 97/19952 est relative à ce récepteur.

20 Six isoformes différentes de l'OBR ayant des domaines C-terminaux de longueurs différentes ont été décrits. Ces isoformes dérivent toutes, par épissages alternatifs, d'un gène unique. Il existe également une forme soluble des OBR contenant le site de liaison à la leptine qui correspond au domaine extracellulaire des formes membranaires. Cette forme soluble générée de façon post-traductionnelle par
25 protéolyse à la membrane plasmique à partir des formes membranaires se retrouve dans le sang. Une autre forme soluble de l'OBR résultant d'une mutation générant un codon stop avant le domaine transmembranaire est également trouvée dans certaines cas très rares.

Une protéine de fusion constituée de la forme longue du récepteur de la leptine
30 (OBR1) fusionnée à la EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) a été utilisée par

Lundin et al (Biochemica et Biophysica Acta, 1499, 130-138, 2000) pour étudier la localisation du récepteur.

L'activation de l'OBR se ferait par l'intermédiaire d'un complexe tétramérique composé de deux janus kinase 2 (JAK2) et de deux OBR. L'activation du récepteur induite par la leptine induirait un changement dans la conformation de l'OBR, qui lui même activerait une JAK2, qui à son tour transphosphorylerait une autre JAK2 puis le récepteur OBR.

L'activation de l'OBR apparaît être responsable de tous les effets connus de la leptine tels que la perte de poids et tous les phénomènes impliqués dans les désordres pondéraux.

Les propriétés inhibitrices de la leptine vis à vis de la synthèse osseuse ont ainsi été récemment mises en évidence. La leptine agit en inhibant l'activité des ostéoblastes, une population de cellules responsables de la formation de l'os.

Modifier la leptinémie pourrait permettre de traiter les maladies liées à une diminution de la densité osseuse comme par exemple l'ostéoporose ou à l'inverse celles liées à une calcification importante.

En 1999 Xu et al (Proc Natl Acad Sci U S A 96, 151-156) ont décrit une méthode de détection des interactions protéine-protéine dans des cellules vivantes. Cette méthode a en outre fait l'objet de la demande de brevet WO99/66324.

Cette méthode, appelée BRET (pour Bioluminescent Resonance Energy Transfer ou transfert d'énergie de bioluminescence par résonance), est basée sur un phénomène naturel, l'émission de fluorescence par des organismes marins. La transformation enzymatique, par la luciférase de *Renilla* (Luc), d'un substrat qui peut traverser la membrane génère une bioluminescence, qui à son tour excite un accepteur d'énergie tel que la protéine fluorescente jaune (YFP ou yellow fluorescent protein en anglais). Cette méthode correspond à la LRET (pour Luminescent Resonance Energy Transfer) décrite par Wang et al (Mol Gen Genet 264 : 578-587 (2001)).

L'efficacité du transfert d'énergie dépend de la proximité physique et des orientations respectives de l'accepteur et du donneur. Ainsi la co-expression de la luciférase et de la YFP n'est pas suffisante pour induire un transfert d'énergie car la distance entre les deux partenaires doit être inférieure à 100Å. Afin d'étudier l'interaction entre deux

partenaires d'interaction potentiels la première protéine a été fusionnée à la luciférase et la seconde protéine à la YFP. Si les deux protéines interagissent un transfert d'énergie peut être observé.

Depuis, la méthode de BRET a été mise en œuvre sur un nombre limité de récepteurs, 5 présentant une structure très différente du récepteur de la leptine.

Ainsi quelques auteurs décrivent la mise en œuvre de la méthode sur des récepteurs de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) tels que les récepteurs β 2 adrénergiques (Angers et al, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 10.1073), cholestylokinines de type A (CCK ;Cheng et al, 2001 . *Biol. Chem.* 276: 48040-48047), 10 et de la thyrotropin releasing hormon (Kroeger et al, 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 12736-12743).

Ces récepteurs de taille importante présentent une structure complexe comprenant 7 domaines transmembranaires.

Enfin Boute et al (2001, *Mol Pharmacol* 60: 640-645) ont décrit le suivi de 15 l'activation du récepteur de l'insuline en utilisant le BRET.

Le récepteur de l'insuline est constitué de dimères covalents, et non de complexes non covalents comme le récepteur de la leptine. En outre il comprend une partie intracellulaire assez longue. Enfin les auteurs montrent que le changement de BRET induit par l'insuline ne peut être mis en œuvre que sur le récepteur solubilisé.

20

En quelques dizaines d'années, l'obésité est devenue un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés où elle touche maintenant 20 à 30 % de la population. Ces chiffres devraient encore croître de façon alarmante dans les années à venir. Du fait de ses origines multifactorielles qui prennent leurs sources à des degrés 25 plus ou moins importants parmi des facteurs environnementaux d'une part (comportements alimentaires, accès à la nourriture, dépense énergétique,...) et des origines génétiques multiples d'autre part, l'obésité constitue un véritable défi pour la médecine.

De même les maladies de l'os, telles que l'ostéoporose, touchent une partie de plus en 30 plus importante de la population.

La découverte de nouvelles molécules permettant de traiter les diverses maladies liées au récepteur de la leptine, telles que l'obésité et l'ostéoporose, est donc un enjeu majeur de la santé publique.

Il n'existe cependant pas de procédé de criblage spécifique d'agonistes ou
5 d'antagonistes du récepteur de la leptine pouvant être mis en œuvre à haut flux.

Les demandeurs se sont donc attachés à la mise en oeuvre d'un test de criblage rapide, spécifique et efficace d'agonistes ou d'antagonistes du récepteur de la leptine.

10 Ils ont montré de manière surprenante que le changement de BRET induit par la leptine pouvait être mis en œuvre sur l'un des isoformes du récepteur de la leptine, mais qu'elle ne pouvait être mis en oeuvre avec tous les isoformes.

Ils ont en outre montré que la mise en oeuvre du BRET sur le récepteur de la leptine
15 est optimale dans certaines conditions opératoires.

La présente invention est donc relative à un procédé de détection de ligands du récepteur de la leptine par mise en œuvre du transfert d'énergie de résonance entre une première protéine de fusion composée d'un récepteur de la leptine, ou d'une
20 partie substantielle d'un récepteur de la leptine, et d'une protéine donneur d'énergie, ou d'une partie substantielle et active d'une protéine donneur d'énergie, et une seconde protéine de fusion composée d'un récepteur de la leptine, ou d'une partie substantielle d'un récepteur de la leptine, et d'une protéine accepteur d'énergie, ou d'une partie substantielle et active d'une protéine accepteur d'énergie.

25

Elle est en outre relative à des protéines de fusion pour la mise en œuvre de ce procédé, ainsi qu'à des acides nucléiques codant ces protéines.

Elle a de plus pour objet un procédé de traitement curatif ou préventif de maladies
30 liées à la leptine consistant à administrer un ligand sélectionné par le procédé défini ci-dessus à un patient atteint par la dite maladie.

Un premier objet de la présente invention est donc une protéine de fusion caractérisée en ce qu'elle est composée d'un récepteur de la leptine, ou d'une partie substantielle d'un récepteur de la leptine et d'une protéine accepteur ou donneur d'énergie, ou
5 d'une partie substantielle et active d'une protéine accepteur ou donneur d'énergie.

Les protéines de fusion selon la présente invention sont composées en substance d'une partie correspondant à une partie ou la totalité de la séquence d'un récepteur de la leptine et d'une partie correspondant à une protéine donneur ou accepteur
10 d'énergie. Elles peuvent néanmoins comprendre d'autres séquences d'acides aminés, issues d'autres protéines, telles que des séquences signal. Ainsi la séquence SEQ ID N°4 est constituée d'une partie de la séquence SEQ ID N°2 et d'autres séquences, et en particulier de la séquence signal de l'interleukine 3 de souris.

15 De manière avantageuse la protéine donneur d'énergie est la luciférase de Renilla. Elle peut néanmoins être toute autre protéine donneur d'énergie telle que le spectre d'émission du donneur chevauche suffisamment le spectre d'excitation de l'accepteur pour permettre un transfert d'énergie efficace entre les deux partenaires. Elle peut ainsi être la GFP, si le transfert d'énergie est le FRET, ou encore l'aequorine si le
20 transfert d'énergie est le CRET. L'aequorine peut être obtenue et utilisée comme décrit dans la demande de brevet EP0 187 519, ou dans l'article de Inouye et al. (PNAS USA 82 : 3154-3158 (1985)).

La protéine fluorescente accepteur d'énergie est quant à elle préférentiellement la
25 DsRed, la GFP ou un mutant de cette protéine, tel que la YFP, l'EYFP, la GFP sauvage, la GFPS65T, ou la Topaz.

Elle peut néanmoins être toute autre protéine fluorescente accepteur d'énergie telle que le spectre d'excitation de l'accepteur et le spectre d'émission du donneur se chevauchent suffisamment pour permettre un transfert d'énergie efficace entre les
30 deux partenaires.

Ces protéines sont connues de l'homme du métier qui peut trouver leurs séquences dans la littérature, notamment dans la revue de Blinks et al. (Pharmacol. Rev. 28 : 1-93 (1976)). En particulier la GFP est décrite par Tsien (Annu. Rev. Biochem. 67 : 509-544 (1998)) et son clonage par Prasher et al. (Gene 111 : 229-233 (1992)). Le clonage de la DsRed est quant à lui décrit par Matz et al. (Nat. Biotechnol. 17 : 969-973 (1999)). Pour la Rluc, l'homme du métier peut se référer à Blinks et al. (Pharmacol. Rev. 28 : 1-93 (1976)) ou encore à Lorenz et al. (PNAS 88: 4438-4442 (1991)).

De manière avantageuse l'isoforme du récepteur de la leptine, compris en totalité ou en partie dans la protéine de fusion, est une isoforme courte, ou présentant un domaine intracellulaire court.

Une telle isoforme comprend avantageusement un domaine intracellulaire Box1, mais ne comprend pas de domaine intracellulaire Box 3.

De manière préférentielle cette isoforme est l'isoforme OBRs et encore plus préférentiellement l'isoforme OBRs humain. Cette isoforme peut néanmoins être originaire de toute autre espèce.

Elle peut aussi être toute autre isoforme, préférentiellement courte, et encore plus préférentiellement comprenant au moins le domaine extracellulaire de l'OBR, telle la forme soluble de l'OBR contenant le site de liaison à la leptine décrite par Lee et al (Nature 379, 632-635 (1996)), Gavrilova et al (JBC 272 :30546-30551 (1997)) Maamr. et al. (Endocrinology 142 :4389-4393 (2001)) ou Clement et al. (Nature 392 :398-401 (1998)).

25

Selon un mode de mise en œuvre particulièrement préférentiel l'isoforme est l'isoforme OBRs humaine de séquence SEQ ID °2. Elle peut aussi être un variant de cette protéine présentant une identité d'au moins 65%, préférentiellement d'au moins 75%, et encore plus préférentiellement d'au moins 85% ou 95%, avec la séquence SEQ ID °2.

30

La protéine de fusion peut ne comprendre qu'une partie de l'isoforme OBRs humaine. Avantageusement elle comprend la partie comprise entre les acides aminés 46 et 866 de la séquence SEQ ID^o2.

- 5 La partie correspondant au récepteur à la leptine peut ainsi présenter la séquence SEQ ID^o4 ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%, préférentiellement d'au moins 75%, et encore plus préférentiellement d'au moins 85% ou 95%.
- 10 De manière particulièrement avantageuse la protéine de fusion donneur présente la séquence SEQ ID N^o6 ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.

- De manière particulièrement avantageuse la protéine de fusion accepteur présente la
- 15 séquence SEQ ID N^o8 ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.

- D'autres objets de la présente invention sont des acides nucléiques codant pour ces protéines. De tels acides nucléiques peuvent être des ADN complémentaires ou
- 20 génomiques, ou des ARN. Ces acides nucléiques ou polynucléotides peuvent être sous forme simple chaîne ou sous la forme de duplex.

Ils sont de manière particulièrement avantageuse des ADN complémentaires.

- 25 De manière préférentielle l'invention a pour objet un acide nucléique ayant une identité d'au moins 65%, préférentiellement d'au moins 75%, et encore plus préférentiellement d'au moins 85% ou 95%, d'identité en nucléotides avec un acide nucléique de séquence SEQ ID N^o5 ou SEQ ID N^o7.

- 30 Selon encore un autre aspect, l'invention est relative à un acide nucléique hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique tel que

défini ci-avant, et plus particulièrement un acide nucléique de séquences nucléotidiques SEQ ID N°5 et SEQ ID N°7, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

- 5 Le « pourcentage d'identité » entre deux séquences de nucléotides ou d'acides aminés, au sens de la présente invention, peut être déterminé en comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

La partie de la séquence nucléotidique ou polypeptidique dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des
10 « gaps ») par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal des deux séquences.

Le pourcentage est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles une base nucléique ou un résidu d'acide aminé identique est observé pour les deux séquences (nucléique ou peptidique) comparées, puis en divisant le nombre de
15 positions auquel il y a identité entre les deux bases ou résidus d'acides aminés par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par 100 afin d'obtenir le pourcentage d'identité de séquence.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus contenus dans le package de la
20 Société WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison, WISCONSIN.

A titre d'illustration, le pourcentage d'identité de séquence pourra être effectué à l'aide du logiciel BLAST (versions BLAST 1.4.9 de mars 1996, BLAST 2.0.4 de février 1998 et BLAST 2.0.6 de septembre 1998), en utilisant exclusivement
25 les paramètres par défaut (S. F Altschul et al, J. Mol. Biol. 1990 215 : 403-410, S. F Altschul et al, Nucleic Acids Res. 1997 25 : 3389-3402). Blast recherche des séquences similaires/homologues à une séquence « requête » de référence, à l'aide de l'algorithme d'Altschul et al. La séquence requête et les bases de données utilisées peuvent être peptidiques ou nucléiques, toute combinaison étant possible.

Par « conditions d'hybridation de forte stringence » au sens de la présente invention, on entendra les conditions suivantes :

1- Compétition des membranes et PRE HYBRIDATION :

- Mélanger : 40 µl ADN sperme de saumon (10mg/ml)+ 40 µl ADN placentaire humain (10mg/ml)
- Dénaturer 5 mn à 96°C, puis plonger dans la glace le mélange.
- Oter le SSC 2X et verser 4 ml de mix formamide dans le tube d'hybridation contenant les membranes.
- Ajouter le mélange des deux ADNs dénaturés.
- 10 - Incubation à 42°C pendant 5 à 6 heures, avec rotation.

2- Compétition de la sonde marquée :

- Ajouter à la sonde marquée et purifiée 10 à 50 µl ADN Cot I, selon la quantité de répétitions.
- Dénaturer 7 à 10 mn à 95°C.
- 15 - Incuber à 65°C pendant 2 à 5 heures.

3- Hybridation :

- Oter le mix de pré hybridation.
- Mélanger 40 µl ADN sperme de saumon + 40 µl ADN placentaire humain ; dénaturer 5 mn à 96°C, puis plonger dans la glace.
- 20 - Ajouter dans le tube d'hybridation 4 ml de mix formamide, le mélange des deux ADN et la sonde marquée/ADN Cot I dénaturée.
- Incuber 15 à 20 heures à 42°C, avec rotation.

4- Lavages :

- Un lavage à température ambiante dans du SSC 2X, pour rincer.
- 25 - 2 fois 5 minutes à température ambiante SSC 2X et SDS 0,1% à 65°C.
- 2 fois 15 minutes à 65°C SSC 1X et SDS 0,1% à 65°C.

Envelopper les membranes dans du Saran et exposer.

- Les conditions d'hybridation décrites plus haut sont adaptées à l'hybridation dans des conditions de forte stringence, d'une molécule d'acide nucléique d'une longueur variable de 20 nucléotides à plusieurs centaines de nucléotides.
- 30

Il va sans dire que les conditions d'hybridation ci-dessus décrites peuvent être adaptées en fonction de la longueur de l'acide nucléique dont l'hybridation est recherchée ou du type de marquage choisi, selon des techniques connues de l'homme du métier.

- 5 Les conditions convenables d'hybridation peuvent par exemple être adaptées selon l'enseignement contenu dans l'ouvrage de HAMES et HIGGINS (1985, "Nucleic acid hybridization : a practical approach", Hames and Higgins Ed., IRL Press, Oxford) ou encore dans l'ouvrage de F.AUSUBEL et al (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y).

10

- Les protéines objets de la présente invention peuvent être obtenues par tous moyens connus de l'homme du métier. Elles sont néanmoins avantageusement obtenues par expression des acides nucléiques tels que décrits ci-dessus, codant pour ces protéines, éventuellement insérés dans des vecteurs d'expression, dans des cellules
15 avantageusement choisies, suivie éventuellement par une extraction et une purification qui peut être totale ou partielle.

L'invention est également relative à un vecteur recombinant comprenant un acide nucléique selon l'invention.

- 20 Avantageusement, un tel vecteur recombinant comprendra un acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques suivants :

- a) un acide nucléique codant pour une protéine ayant au moins 65% d'identité en acides aminés avec une séquence SEQ ID N°6 ou SEQ ID N°8 ou un fragment peptidique ou un variant de cette dernière ;
- 25 b) un acide nucléique comprenant un polynucléotide ayant une séquence SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7, ou un fragment ou un variant de ce dernier ;
- c) un acide nucléique ayant au moins 65% d'identité en nucléotides avec un acide nucléique ayant une séquence SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7 ou un fragment ou un variant de ce dernier ;

d) un acide nucléique hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique de séquences SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7, ou un fragment ou un variant de ce dernier.

5 Par « vecteur » au sens de la présente invention on entendra une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme de simple brin ou double brin.

Selon un mode de réalisation, le vecteur d'expression comprend, outre un acide nucléique conforme à l'invention, des séquences régulatrices permettant d'en
10 diriger la transcription et/ou la traduction.

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur recombinant selon l'invention comprendra notamment les éléments suivants :

- (1) des éléments de régulation de l'expression de l'acide nucléique à insérer, tels que des promoteurs et des enhanceurs ;
- 15 (2) la séquence codante comprise dans l'acide nucléique conforme à l'invention à insérer dans un tel vecteur, ladite séquence codante étant placée en phase avec les signaux de régulation décrits aux (1) ; et
- (3) des séquences d'initiation et d'arrêt de la transcription appropriées.

20 En outre, les vecteurs recombinants selon l'invention pourront inclure une ou plusieurs origines de répllication chez les hôtes cellulaires dans lesquels leur amplification ou leur expression est recherchée, des marqueurs ou des marqueurs de sélection.

A titre d'exemples, les promoteurs pour cellules eucaryotes comprendront le
25 promoteur de la thymidine kinase du virus HSV ou encore le promoteur de la métallothionéine-L de souris.

De manière générale, pour le choix d'un promoteur adapté, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de SAMBROOK et al. (1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd ed., Cold Spring Harbor
30 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.) ou encore aux techniques décrites par

FULLER et al. (1996, *Immunology in Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al).

Les vecteurs préférés selon l'invention sont des plasmides, tels que par exemple les vecteurs pCDNA3 (Invitrogen), pQE70, pQE60, pQE9 (Qiagen),
5 psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG(Stratagene).

Il peut s'agir également de vecteurs de type *baculovirus* tel que le vecteur pVL1392/1393 (PharMingen) utilisé pour transfecter les cellules de la lignée Sf9 (ATCC N°CRL 1711) dérivées de *Spodoptera frugiperda*.

10 Il peut encore s'agir de vecteurs adénoviraux tels que l'adénovirus humain de type 2 ou 5.

Un vecteur recombinant selon l'invention peut aussi être un vecteur rétroviral ou encore un vecteur adéno-associé (AAV). De tels vecteurs adéno-associés sont par exemple décrits par FLOTTE et al. (1992, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 7 : 349-356)
15

La présente invention a en outre pour objets des cellules comprenant une protéine, un acide nucléique ou un vecteur tels que décrits ci dessus, ou des fragments de ces cellules, des lysats de ces cellules ou encore des membranes de ces cellules.

20 De telles cellules peuvent être cellules isolées d'un organisme et cultivées dans un milieu de croissance adéquat. Elles sont néanmoins préférentiellement des lignées cellulaires. Ainsi de telles lignées sont de manière particulièrement avantageuse les lignées cellulaires HEK 293, COS (ATCC N°CRL 1650), COS-M6 et HeLa (ATCC N°CCL2), ou encore Cv 1 (ATCC N°CCL70), Sf-9 (ATCC N°CRL 1711), CHO
25 (ATCC N°CCL-61) ou 3T3 (ATCC N°CRL-6361).

Les membranes de ces cellules peuvent être préparées par toute méthode connue de l'homme du métier.

Préférentiellement elles seront préparées par broyage mécanique des cellules puis
30 centrifugation des suspensions obtenues, comme illustré dans les exemples qui suivent.

La présente invention est en outre relative à des compositions comprenant des cellules telles que décrites ci dessus et de la saponine.

- 5 La présente invention est en outre relative à un procédé de détermination de la liaison de composés au récepteur de la leptine comprenant les étapes consistant à :
- mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie telle que décrite ci dessus, et une protéine de fusion accepteur d'énergie telle que décrite ci dessus, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules
- 10 comprenant une telle protéine, et un substrat enzymatique adéquat, et
- à mesurer le transfert d'énergie.

Préférentiellement ledit procédé est mis en œuvre avec des cellules traitées par de la saponine.

- 15 Les protéines de fusion donneur d'énergie et les protéines de fusion accepteur d'énergie sont choisies de manière à ce que l'énergie résultant de l'activation du donneur puisse être transférée de manière efficace à l'accepteur.

- 20 Dans un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, la protéine de fusion donneur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine, ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la luciférase ou une partie substantielle de la luciférase, auquel cas le substrat est avantageusement la coelenterazine.

- 25 Dans un mode de mise en œuvre préférentiel dudit procédé, la protéine de fusion accepteur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine, ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la YFP ou une partie substantielle de la YFP.

Dans un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester est comparé à celui mesuré en absence du composé à tester.

- 5 Préférentiellement le procédé est mis en oeuvre sur des membranes des cellules, telles que décrites ci dessus.

De manière préférentielle les protéines donneur et accepteur selon la présente invention sont choisies afin que le transfert d'énergie se fasse par résonance BRET,
10 ou LRET. Néanmoins un tel transfert d'énergie peut être effectué par FRET (pour Fluorescent Resonance Energy Transfer ou transfert d'énergie de fluorescence par résonance) ou encore par CRET (pour Chemiluminescent Resonance Energy Transfer ou transfert d'énergie de chimiluminescence par résonance).

Quelque soit le type de transfert d'énergie les couples protéine de fusion donneur/
15 protéine de fusion accepteur d'énergie sont choisis afin de permettre un tel transfert.

Le CRET consiste en un transfert d'énergie entre l'aequorine, qui est une luciférase, et la GFP.

Le FRET consiste en un transfert d'énergie entre deux protéines de la famille des
20 GFP ayant des spectres différents.

Pour la mise en œuvre de ces transferts l'homme du métier peut se référer à Baubet et al. (PNAS USA 97 : 7260-7265 (2000)) pour la CRET, à Matyus (J Photochem Photobiol B 12: 323-337 (1992)) et Pollok et Heim (Trends Cell Biol 9:57-60 (1999)) pour la FRET.

25

Un autre objet de la présente invention est un procédé de criblage ou de détection de composés destinés à la prévention et / ou au traitement de pathologies liées à la leptine comprenant les étapes consistant à :

- 30 -mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie telle que décrite ci dessus, et une protéine de fusion accepteur d'énergie telle que décrite ci

dessus, ou des cellules en absence ou présence de saponine, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
-à mesurer le transfert d'énergie.

5

Un tel procédé peut être utilisé pour le criblage d'agonistes ou d'antagonistes du récepteur de la leptine.

Le procédé selon la présente invention est compatible avec les plaques à 96 ou 384 puits généralement utilisées. Il ne nécessite pas l'utilisation de molécules radioactives, est sensible, reproductible, rapide et le résultat est facile à lire. En effet ce procédé a un bon rapport signal/bruit de fonds et une faible réactivité croisée avec d'autres ligands que la leptine. Ceci s'explique au moins en partie par le fait que la détection de l'activation de l'OBR est directement effectuée au niveau du récepteur, ce qui permet d'éliminer des sources possibles de réactivité croisée à d'autres niveaux des voies de signalisation comme on peut l'observer dans le cas de dosages basés sur des gènes rapporteur ou sur la croissance de cellules.

15

De plus ce procédé n'est pas limité à une voie de transduction ayant un signal spécifique mais au contraire est susceptible de détecter toutes les molécules interagissant avec les OBR.

20

Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour la mise en oeuvre de criblage à grande échelle, puisque de plus en plus de ligands de récepteurs membranaires s'avèrent activer certaines voies mais pas d'autres voies.

25 La présente invention est en outre relative à l'utilisation de composés sélectionnés par un procédé consistant à :

-mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie, et une protéine de fusion accepteur d'énergie telle que décrite ci-dessus, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
30 -à mesurer le transfert d'énergie,

pour la fabrication d'un médicament pour le traitement curatif ou préventif de maladies liées à la leptine ou à son récepteur.

Elle a enfin pour objet un procédé de traitement curatif ou préventif de maladies liées
5 à la leptine ou à son récepteur comprenant les étapes de:

-sélection dudit composé par un procédé consistant à :

+mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie et
une protéine de fusion accepteur d'énergie, ou des cellules, ou des fragments, des
lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et un substrat
10 enzymatique adéquat, et

+à mesurer le transfert d'énergie, et

-d'administration dudit composé à un patient atteint par la dite maladie.

15 De telles maladies peuvent être des maladies liées à une diminution de la densité osseuse comme par exemple l'ostéoporose ou à l'inverse celles liées à une calcification importante.

Elles peuvent aussi être des maladies ayant un effet sur le poids, telles que l'obésité, le diabète ou l'anorexie.

20 Les composés de l'invention peuvent être formulés dans des compositions pharmaceutiques en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc. Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en
25 particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Enfin le procédé selon la présente invention permet aussi le criblage de sérum de patients obèses pour la présence ou l'absence de leptine non fonctionnelle ou encore le criblage de molécules interférant avec la dimérisation de l'OBR.

- 5 La figure 1 représente schématiquement les protéines de fusion. Box1 représente le site de liaison de JAK2; Box3 représente le site de liaison des protéines STAT; TM représente le domaine trans-membranaire.

Les figures 2a et 2b illustrent l'expression des constructions OBR dans des cellules
10 COS estimée par des expériences de radio-marquage utilisant la ^{125}I -leptine comme radio-ligand. Dans les figures 2a et 2b le contenu cellulaire total en OBR et le pourcentage de sites de liaison à la surface des cellules sont respectivement mesurés.

La figure 2c illustre la localisation cellulaire de l'expression des constructions OBR1-YFP et OBRs-YFP en présence et en absence de leptine.

- 15 La figure 2d illustre l'activation de JAK2 par différentes constructions OBR.

La figure 2e illustre l'effet de la stimulation par la leptine de cellules co-exprimant le gène rapporteur pour STAT3 et différentes constructions OBR.

La figure 3 illustre la dimérisation constitutive de OBR. Des cellules HEK 293
20 exprimant les différentes constructions OBR indiquées sont incubées en présence de coelenterazine. Le transfert d'énergie est mesurée à l'aide d'un luminomètre.

Les figures 4a et 4b illustrent l'effet de la liaison de la leptine sur le BRET constitutif des OBR.

- 25 Figure 4a: des cellules HeLa exprimant les différentes constructions OBR indiqués sont incubées en présence de leptine avant d'initier la réaction de la luciférase. Le transfert d'énergie est mesurée à l'aide d'un luminomètre.

Figure 4b: L'effet de la leptine est comparé dans des cellules entières co-exprimant OBRs-Luc et OBR-YFP, en absence ou présence de saponine, dans des lysats totaux
30 et dans des préparations membranaires.

Les figures 5a à 5e illustrent l'optimisation et la caractérisation du changement du BRET induit par la leptine sur les OBRs. Des membranes préparées à partir de cellules HeLa ou COS co-exprimant OBRs-Luc et OBRs-YFP ont été pré-incubées avec ou sans leptine avant d'initier la réaction de la luciférase.

5 Figure 5a: Optimisation des niveaux d'expression de OBRs-Luc et de OBRs-YFP relatifs et absolus.

Figure 5b : Variation du signal de BRET induit par la leptine en fonction du temps.

Figure 5c : Courbes dose-réponse BRET/concentration en leptine sur membrane et cellules intacte en présence de saponine (0.05%).

10 Figure 5d : Compétition de la liaison de la 125 I-leptine par augmentation des concentrations croissantes de la leptine.

Figure 5e: Spécificité des changements de BRET induits par la leptine. Les membranes ont été pré-incubées avec des concentrations saturantes d'érythropoïétine (EPO, 10U /ml), de trombopoïétine (TPO, 10 nM), de granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF, 250 ng/ml), d'interleukine 3 (IL3, 280 ng/ml), d'interleukine 6 (IL6, 100 ng/ml), de prolactine (PRL, 200 ng/ml), de stem cell factor α (SCF α , 250 ng/ml), d'epidermal growth factor (EGF, 100 ng/ml), d'insuline (Ins, 100 nM), de lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) et de tumor necrosis factor α (TNF α , 50ng/ml).

20 Figure 6 : Co-transfectées de cellules COS avec une quantité constante d'OB-Rs-Luc (50ng) et une quantité croissante d'OB-Rs-YFP : \circ , 200 ng ; \bullet , 400 ng ; Δ , 800 \blacklozenge , 1600 ; \diamond , 3200. Les mesures de BRET ont été faites sur les cellules en présence de saponine (0,015%), incubées ou non avec des doses croissantes de leptine, et sont exprimées en mBRET.

25

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent.

Matériels et Méthodes utilisés dans les exemples

30

Constructions plasmidiques, transfections et culture cellulaire.

Les protéines de fusion OB-R-YFP et OB-R-Luc ont été construites par ligation de la YFP et de Luc à l'extrémité C-terminale des récepteurs par des techniques classiques de biologie moléculaire. Les régions codantes de YFP obtenues à partir du vecteur pGFPtpz-N1 Cytogem®-Topaze (Packard, Meriden, CT) ont été insérées dans le site
5 EcoRV de pcDNA3/CMV (Invitrogen, Groningen, Netherlands) qui contient un site polylinker modifié. La région codante de *Renilla* luciferase a été obtenue à partir de pRL-CMV (Promega, Madison, WI) et insérée dans le site EcoRV du pcDNA3modifié. Les régions codantes de OBRI et OBRs (don de Dr. Gainsford, Royal Melbourne Hospital, Victoria, Australia) ont été insérées dans les deux
10 vecteurs décrits ci dessus, respectivement dans les sites de clonage EcoRI/BamHI et NheI. Les codons Stop ont été délétés par mutagenèse dirigée et la phase de la protéine de fusion a été ajustée.

Les lignées cellulaires HEK 293, COS-M6 et HeLa ont été cultivées dans du DMEM complété avec les composants suivants : 10% (v/v) FBS, 4.5 g/litre glucose, 100 U/ml
15 pénicilline, 0.1 mg/ml streptomycine, 1 mM glutamine (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Les transfections transitoires ont été effectuées en utilisant le réactif de transfection FuGene 6 (Roche, Bale, Suisse).

20 Microscopie par Fluorescence.

Deux jours après la transfection avec les constructions YFP, les cellule ont été incubées avec 100 nM leptine durant 60 min et 0.01 mM bis-benzamidine durant 15 min avant d'être lavées dans du PBS et fixées durant 20 min à température ambiante dans une solution froide de 4% paraformaldéhyde dans du PBS. Les coupes sont
25 observées par microscopie fluorescente en utilisant des filtres FITC et DAPI.

Préparation des membranes et solubilisation.

Les cellules ont été placées dans la glace, lavées deux fois dans du PBS à la température de la glace et détachées de manière mécanique dans un tampon 1 (5 mM
30 Tris, 2 mM EDTA, pH 7.4, 5 mg/litre d'inhibiteur de la trypsine de soja, 5 mg/litre de leupeptin, et 10 mg/litre de benzamidine) à la température de la glace.

Les suspensions cellulaires sont homogénéisées avec un homogénéiseur Polytron (Janke & Kunkel Ultra-Turrax T25) trois fois durant 5 sec. Le lysat est centrifugé à 450 X g durant 5 min à 4°C et le surnageant est centrifugé à 48000 X g durant 30 min à 4°C. Le culot final est lavé deux fois dans du tampon 1 et resuspendu dans une solution (75 mM Tris (pH 7.4), 12.5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA avec des inhibiteurs de protéases, comme décrits ci dessus) et immédiatement utilisé dans des expériences de liaison de ligands radioactifs ou des expériences de BRET.

Immunoprécipitation de JAK2

Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec des plasmides exprimant JAK2 marquée par HA2 (don de Dr. Wojchowski, Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA) et des plasmides contenant différentes constructions d'OBR. Les cellules ont été lysées dans du tampon de lyse (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5% glycerol, 0,02% NaN₃, NP40 0,1%, orthovanadate 1mM, 5 mg/litre d'inhibiteur de la trypsine de soja et 10 mg/litre de benzamidine) et centrifugées durant 15 min à 13000 rpm. La fraction soluble a été immunoprécipitée durant 2h avec un anticorps polyclonal anti-JAK2 (HR-758) (1µg/ml) (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Immunoabsorption SDS-Page

Les immunoprécipitats JAK2 ont été dénaturés dans la solution (62.5 mM Tris/HCl (pH 6.8), 5% SDS, 10% glycerol et 0.05% bleu de bromophenol), à 100°C durant 10 minutes. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE en 7 % de poly-acrylamide et transférées sur nitrocellulose. L'immuno-détection a été effectuée avec un anticorps anti-phosphotyrosine 4G10 (2 µg/ml) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). L'immunoréactivité a été révélée en utilisant un anticorps secondaire approprié couplé à la peroxydase de raifort et le réactif chimio-luminescent ECL (Amersham, Aylesbury, UK).

Test de liaison de la ¹²⁵I-leptine

Des cellules transfectées ont été carencées en sérum dans du DMEM (1% BSA) 24 h avant les expériences de liaison. Pour mesurer la liaison de la leptine à la surface des cellules, des cellules ont été lavées deux fois avec du PBS à la température de la glace et incubées dans un tampon de liaison (DMEM, 25 mM Hepes pH 7.4, 1% BSA) contenant 100000 cpm/puits de ^{125}I -leptine (PerkinElmer life sciences, Paris, France) en absence ou en présence de 200 nM de leptin non radioactive (leptine humaine recombinante (PeproTech Inc, USA) durant 4 h à 4°C. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS à la température de la glace, lysées dans 1N NaOH et la radioactivité déterminée dans un compteur à radiations gamma. Afin de mesurer la quantité totale de leptine se liant dans l'extrait, les cellules ont été mises en suspension dans 1.5 ml de tampon de liaison contenant 0.15% de digitonine durant 2h à 4°C. Les extraits ont été centrifugés durant 30 min dans une centrifugeuse Eppendorf à vitesse maximale à 4°C. Le surnageant (0.2 ml) a été incubé avec 100000 cpm de ^{125}I -leptine en présence ou en absence de 200 nM de leptine dans un volume total de 0.25 ml avec agitation toute la nuit à 4°C. 0.5 ml de γ -globuline (1.25 mg/ml) et 0.5 ml de polyethylene glycol 6000 (25% p/v) ont été ajoutés pour précipiter les complexes récepteur-ligand, qui sont obtenus par centrifugation (17000 x g durant 3 min). Le culot est lavé avec 1 ml de polyéthylène glycol 6000 12 % (p/v) puis compté.

20

Activation du gène rapporteur

Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec 2.6 μg de plasmide portant le gène reporteur STAT3 (don de Dr. Levy, New York University, New York, USA), 200 pg de pcDNA3 comprenant la région codante de la Renilla luciférase (utilisée comme témoin interne) et avec 1.4 μg des différentes constructions OBR ou avec le véhicule seul. 48 heures après la transfection, les cellules ont été carencées durant la nuit en DMEM (1% BSA) avant la stimulation par 1nM de leptine durant 6 - 8 heures. Les cellules ont alors été lavées et lysées dans un tampon de lyse passive (Promega Corporation, Madison, WI) durant 15 minutes à température ambiante. Les lysats totaux ont été centrifugé durant 2 minutes à 15000 rpm et les surnageants ont été utilisés dans un test de dosage de la Luciférase ((Promega Corporation, Madison,

30

WT) en utilisant un luminomètre Berthold (Lumat LB 9507). Les résultats sont exprimés par le rapport des activités luciférase de luciole ((firefly) / luciférase de *Renilla*.

5 Mesure de BRET

48 heures après la transfection des cellules HeLa, COS et HEK 293 exprimant OBR ont été détachées et lavées avec du PBS. $1-2 \times 10^5$ cellules ont été distribuées dans des plaques optiques à 96 puits (Packard Instrument Company, Meriden, CT) en absence ou en présence de ligands, à 25°C. Des membranes préparées à partir de cellules
10 exprimant OBR ont été utilisées pour les mesures de BRET. Le substrat, la coelenterazine h (Molecular Probes, Eugene, OR) est ajouté à une concentration finale de 5 μ M et la lecture est faite avec un fluoro/luminomètre FusionTM (Packard Instrument Company, Meriden, CT) qui permet l'intégration séquentielle des signaux de luminescence détectés avec deux filtres (filtre Luc: 485 ± 10 nm; filtre YFP: 530 ± 12.5 nm). Le rapport BRET est défini comme la différence de l'émission à 530
15 nm/485 nm des protéine de fusion Luc et YFP co-transfectées et l'émission à 530 nm/485 nm de la protéine de fusion Luc seule. Les résultats sont exprimés en unités milliBRET (mBU), 1 unité mBRET correspondant à la valeur du rapport BRET multiplié par 1000. Les ligands suivants ont été utilisés pour déterminer la spécificité
20 du dosage: érythropoïétine humaine recombinante (EPO), insuline (Ins), lipopolysaccharide (LPS, Sigma Aldrich, St Louis, USA), trombopoïétine Humaine recombinante (TPO), GM-CSF, interleukine 3 (IL3), interleukine 6 (IL6), prolactine (PRL), SCF, EGF et TNF α .

25

Exemple 1 : Expression fonctionnelle des protéines de fusion OBR

La forme longue (OBRI) et la forme courte (OBRs) des OBR on été fusionnées à leurs extrémités C-terminale avec la YFP ou la Luc (Fig. 1). L'expression de ces protéines de fusion a été confirmée dans des cellules COS transfectées dans des
30 expériences de liaison avec la ¹²⁵I-leptin (Fig. 2a). Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules HeLa transfectées.

L'expression à la surface des cellules des protéines de fusion et des récepteurs de type sauvage exprimés dans les cellules COS varient entre 5 et 10 %, ce qui est en accord avec des valeurs déjà décrites. Des valeurs similaires sont obtenues dans des cellules HEK 293 exprimant des OBR endogènes (14 ± 3 %).

5 La localisation des protéines de fusion OBR dans les cellules HeLa a été étudiée par microscopie de fluorescence en utilisant les protéines de fusion avec YFP. La fluorescence due à OBRI-YFP est répartie ponctuellement dans les cellules tandis que celle due à OBRs-YFP est localisée dans des plaques. La stimulation par la leptine localise OBRI-YFP dans de grandes plaques intracellulaires correspondant
10 probablement au compartiment endosomal. La localisation de OBRs-YFP ne change pas de manière significative. Les résultats obtenus par microscopie à fluorescence confirment la localisation prédominante de OBR dans le compartiment intracellulaire et sont cohérents avec la localisation déjà décrite de la protéine de fusion OBRI-GFP dans des cellules COS.

15 L'expression fonctionnelle des protéines de fusion est évaluée par mesure de l'activation de la voie JAK-STAT. Les kinases JAK2 sont associées avec les domaines intracellulaires de OBRs et OBRI. La liaison de ligands induit la transphosphorylation de JAK2 et la phosphorylation de OBRI mais pas d'OBRs. OBRI phosphorylé fournit ensuite un site d'accrochage pour les protéines STAT, qui sont
20 activées par phosphorylation de la tyrosine après liaison au récepteur. Les protéines STAT activées dimèrisent alors et sont transloquées au noyau où elles stimulent la transcription de gènes par l'intermédiaire d'éléments de réponse au STAT comme décrit par Tartaglia (1997, J Biol Chem 272, 6093-6096).

Comme le montre la figure 2c toutes les constructions OBRs induisent la
25 phosphorylation de JAK2 ce qui indique une activation de JAK2. L'activité du gène rapporteur STAT3 est activée d'un facteur 2-4 par OBRI-wt et les protéines de fusion OBRI tandis que les isoformes courtes n'ont pas d'effet sur l'activité du gène rapporteur. Ces résultats indiquent que les protéines de fusion OBR sont fonctionnellement exprimées dans les cellules HeLa.

30

Exemple 2: Dimerisation constitutive de OBR dans des cellules vivantes.

La dimérisation de OBR-Luc et OBR-YFP a été étudiée dans des cellules vivantes. Des transferts d'énergie significatifs ont été observés entre OBRs-Luc et OBRs-YFP ainsi qu'entre OBRl-Luc et OBRl-YFP, exprimés dans des quantités équimolaires, ce qui indique que des homo-dimères constitutifs existent pour les deux récepteurs (Fig. 3 a, b). L'existence des hétéro-dimères OBRs/OBRl dans les cellules vivantes est démontrée par la détection de BRET entre OBRs-Luc et OBRl-YFP ainsi qu'entre OBRl-Luc et OBRs-YFP. La spécificité de ces interactions est illustrée par l'absence de transfert significatif entre OBRs-Luc et OBRl-Luc et une protéine fusion entre l'YFP et le récepteur de l'insuline décrite récemment (Boute et al., 2001 précédemment cités). Ces résultats indiquent que les isoformes courtes et longues sont impliqués dans des hétéro et homo complexes dans les cellules vivantes.

Exemple 3: Effet de la liaison de la leptine sur le BRET constitutif des OBR :

- 15 Afin d'évaluer les effets agonistes sur le BRET constitutif, les cellules ont été pré-incubées avec la leptine avant d'initier la réaction de la luciférase avec son substrat. Aucun changement dans le BRET constitutif n'est observé avec les homodimères OBRl et les deux combinaisons d'hétéro dimères OBRs/OBRl alors que le BRET est augmenté avec les homo dimères OBRs (Fig. 4 a).
- 20 Les changements de BRET des homo dimères OBRs induits par la leptine ont ensuite été mesurés dans différentes préparations cellulaires.
- La rupture mécanique des cellules dans un tampon hypotonique améliore de manière significative l'augmentation du BRET par la leptine tandis que le BRET basal reste inchangé.
- 25 Des résultats similaires ont été obtenus avec la fraction membranaire après séparation du cytosol. Tandis que tous les couples OBRs-Luc/OBRs-YFP contribuent au BRET basal, seuls les récepteurs exposés à la surface de la cellule (5–10 %) peuvent être stimulés par la leptine qui est imperméable aux membranes dans des cellules intactes. La disruption des membranes cellulaires augmente la fraction d'OBR accessible à la
- 30 leptine et qui est responsable de l'augmentation du BRET induit par la leptine.

Des résultats similaires ont été obtenus sur cellules traitées avec la saponine. Ce composant fait des trous dans les membranes et permet la pénétration des protéines comme la leptine dans les compartiments intracellulaires où se trouve la majorité des OBRs.

- 5 Aucun changement de BRET induit par la leptine n'a été observé dans des expériences analogues effectuées avec des préparations à partir de cellules exprimant des homo-dimères OBR1 –ou des hétéro-dimères OBRs/OBR1.

Les quantités de et les rapports de OBRs-Luc et OBRs-YFP ont ensuite été modulés afin d'optimiser le BRET induit par la leptine (Fig. 5a). Les meilleurs résultats sont
10 obtenus quand 500 ng d'ADN codant pour OBRs-Luc et 250 ng d'ADN codant pour OBRs-YFP sont utilisés.

Dans ces conditions optimisées une concentration saturée de leptine induit une augmentation d'un facteur 2 – 2.5 du signal BRET basal dans des cellules incubées avec la saponine ou membranes préparées à partir de cellules exprimant des homo-
15 dimères OBRs. Cette augmentation est fonction du temps. Les valeurs maximales sont atteintes après 20 minutes d'incubation avec 1nM leptine à température ambiante (Fig. 5b). Pour des concentrations supérieures en leptine, les valeurs maximales sont obtenues après 5 minutes d'incubation à température ambiante.

L'effet de la leptine est dose-dépendant avec un EC50 d'environ 100 pM (Fig. 5c),
20 ce qui est en accord avec les valeurs de K_i obtenues avec les protéines de fusion OBRs-Luc (116 pM) et OBRsYFP (35 pM) (Fig 5 d). La spécificité du test est démontrée par l'absence de BRET induite par le ligand par une concentration saturante de plusieurs cytokines et d'autres ligands de récepteurs membranaires tels que l'érythropoïétine, la thrombopoïétine, le GM-CSF, l'IL3, l'IL6, la PRL, le SCF α ,
25 l'EGF, l'insuline, le LPS et le TNF α .

La répartition des récepteurs en dimères suit des lois statistiques, et à un rapport 1/1 en nombre de récepteurs on s'attend à la répartition suivante si tous les récepteurs sont sous forme dimérique: 1/4 Luc/Luc, 1/4 YFP/YFP et 1/2 de récepteurs capables d'engendrer un signal de BRET (1/4 Luc/YFP, 1/4 YFP/Luc). Cependant lors des
30 mesures de BRET, l'ensemble des molécules fusionnées à la Luc donnent un signal de luminescence et donc à un rapport 1/1 on observe la moitié des récepteurs capables

de BRET, sur une population donneuse totale. Aussi, pour augmenter le signal de BRET, on a réalisé des expériences de saturation des molécules Luc par les molécules YFP de façon à avoir l'ensemble des molécules Luc sous forme de dimères avec les molécules YFP (capables de BRET). Les résultats de la figure 6, montrent que le
5 signal de BRET basal augmente lors de la saturation et que l'induction par la leptine est proportionnelle au signal basal, avec une stimulation de 2-2,5 fois le BRET basal. A saturation on obtient une meilleure résolution du BRET basal et induit, permettant un criblage plus aisé pour la recherche de molécules.

REVENDICATIONS

1. Protéines de fusion caractérisée en ce qu'elle est composée d'un récepteur de la leptine présentant un domaine intracellulaire court ou d'une forme soluble d'un tel récepteur contenant le site de liaison à la leptine., ou d'une partie substantielle d'un tel récepteur de la leptine, et d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie, ou d'une partie substantielle et active d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie.
2. Protéine de fusion selon la revendication 1 caractérisée en ce que le récepteur de la leptine est une isoforme courte.
3. Protéine de fusion selon la revendication 1 caractérisée en ce que le récepteur de la leptine est une isoforme comprenant un domaine intracellulaire Box1, mais ne comprenant pas de domaine intracellulaire Box 3.
4. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que le récepteur de la leptine est l'isoforme OBRs.
5. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que le récepteur de la leptine est l'isoforme OBRs humaine de séquence SEQ ID N°2, ou un variant de ce récepteur présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°2
6. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que la séquence du récepteur de la leptine est la séquences des acides aminés 46 à 866 de l'isoforme OBRs humaine de séquence SEQ ID N°2, ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.

7. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce le récepteur de la leptine présente la séquence SEQ ID N°4, ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.
- 5
8. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce que la protéine est une luciférase.
9. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce que la protéine est la GFP ou un mutant de cette protéine ou la DsRed
- 10
10. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce que le mutant de la GFP est la YFP, l'EYFP, la GFP sauvage, la GFPS65T, ou la Topaz.
- 15
11. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID N°6 ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.
- 20
12. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID N°8 ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.
- 25
13. Acide nucléique codant pour l'une des protéines selon l'une des revendications 1 à 12.
14. Acide nucléique selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il présente la séquence SEQ ID N°5.
- 30
15. Acide nucléique selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il présente la séquence SEQ ID N°7.

16. Acide nucléique présentant une identité d'au moins 65% avec une séquence selon l'une des revendications 14 et 15.
- 5 17. Acide nucléique hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence selon l'une des revendications 14 et 15.
18. Cellule comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 13 à 17.
- 10 19. Cellule exprimant une protéine selon l'une des revendications 1 à 12
20. Fragments de cellules selon l'une des revendications 18 et 19.
21. Lysat de cellules selon l'une des revendications 18 et 19.
- 15 22. Membranes de cellules selon l'une des revendications 18 et 19.
23. Composition comprenant des cellules selon l'une des revendications 18 et 19 et de la saponine.
- 20 24. Procédé de détermination de la liaison de composés au récepteur de la leptine comprenant les étapes consistant à :
- mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, et une protéine de fusion accepteur
- 25 d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
- à mesurer le transfert d'énergie.
- 30 25. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce que la protéine de fusion donneur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine,

ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la luciférase ou une partie substantielle de la luciférase.

5 26. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce qu'il est mis en œuvre avec les cellules traitées avec de la saponine

10 27. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce que la protéine de fusion accepteur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine, ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la YFP ou une partie substantielle de la YFP.

28. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce que le substrat est la coelenterazine.

15 29. Procédé selon la revendication 24 caractérisée en ce que le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester est comparé à celui mesuré en absence du composé à tester.

20 30. Procédé de criblage ou de détection de composés destinés à la prévention et / ou au traitement de pathologies liées à la leptine comprenant les étapes consistant à :

25 -mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, et une protéine de fusion accepteur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
-à mesurer le transfert d'énergie.

30 31. Procédé de criblage d'agonistes ou d'antagonistes du récepteur de la leptine comprenant les étapes consistant à :

- 5 -mettre en contact les agonistes ou d'antagonistes potentiels avec une protéine de fusion donneur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, et une protéine de fusion accepteur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
-à mesurer le transfert d'énergie.

32. Utilisation de composés sélectionnés par un procédé consistant à :

- 10 -mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12 et une protéine de fusion accepteur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et un éventuellement substrat enzymatique adéquat, et
-à mesurer le transfert d'énergie,
15 pour la fabrication d'un médicament pour la traitement curatif ou préventif de maladies liés à la leptine, ou à son récepteur.

33. Procédé de traitement curatif ou préventif de maladies liés à la leptine, ou à son récepteur, comprenant les étapes:

- 20 -de sélection dudit composé par un procédé consistant à :
+mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, et une protéine de fusion accepteur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, ou des cellules, ou des fragments, des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et un
25 éventuellement substrat enzymatique adéquat, et
+à mesurer le transfert d'énergie, et
-d'administration dudit composé à un patient atteint par la dite maladie

Figure 1

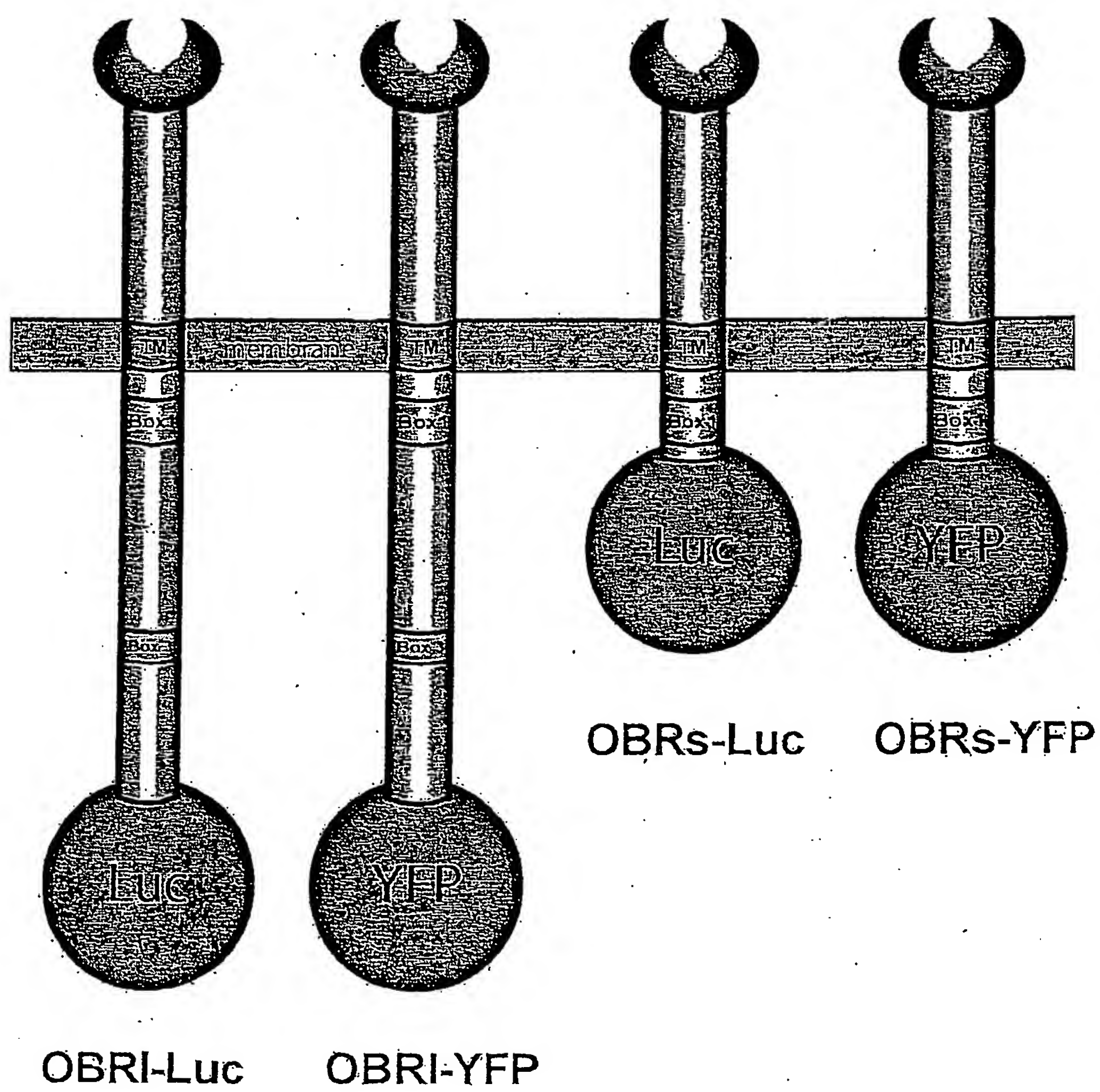


FIGURE 2A

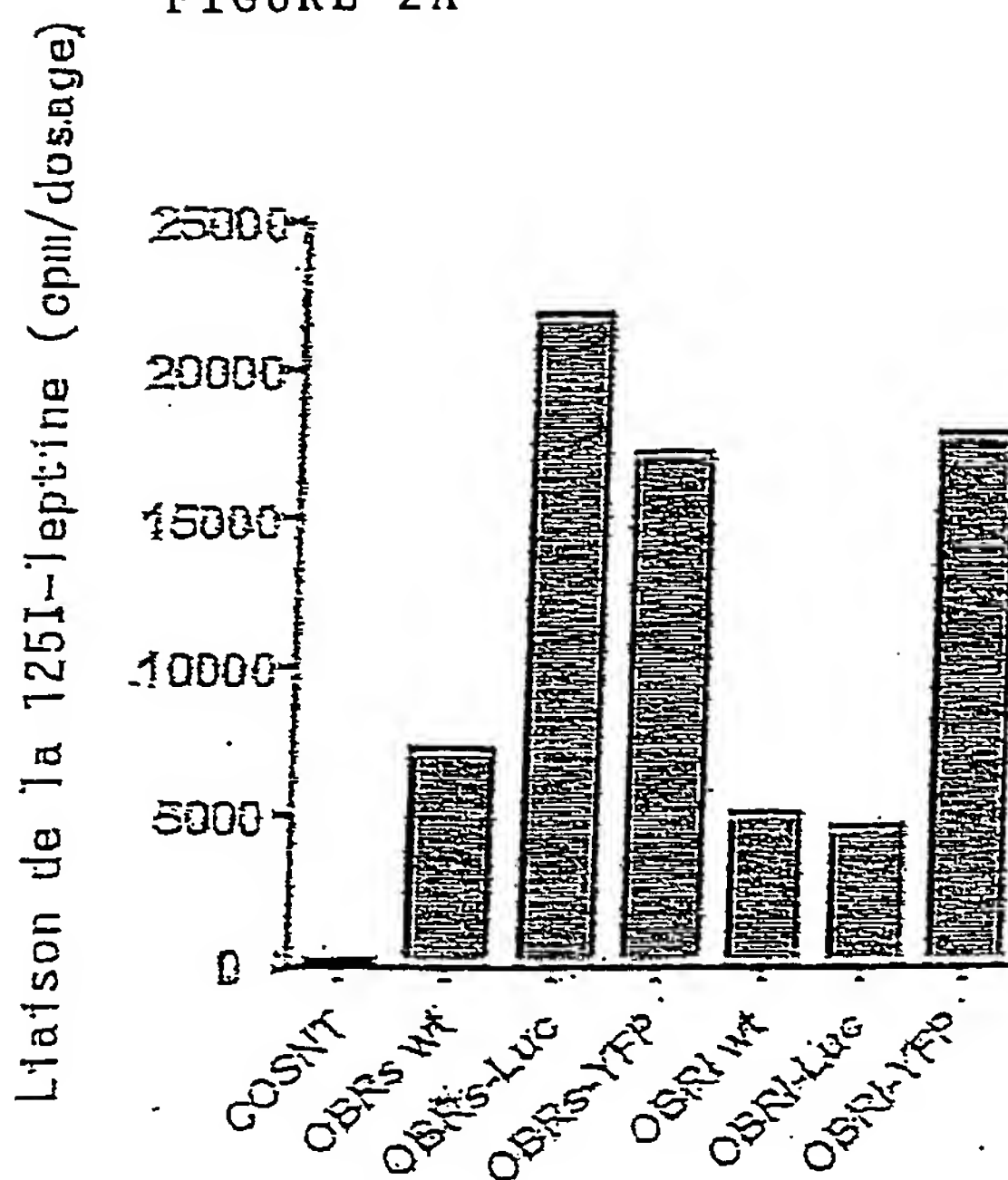


Figure 2B

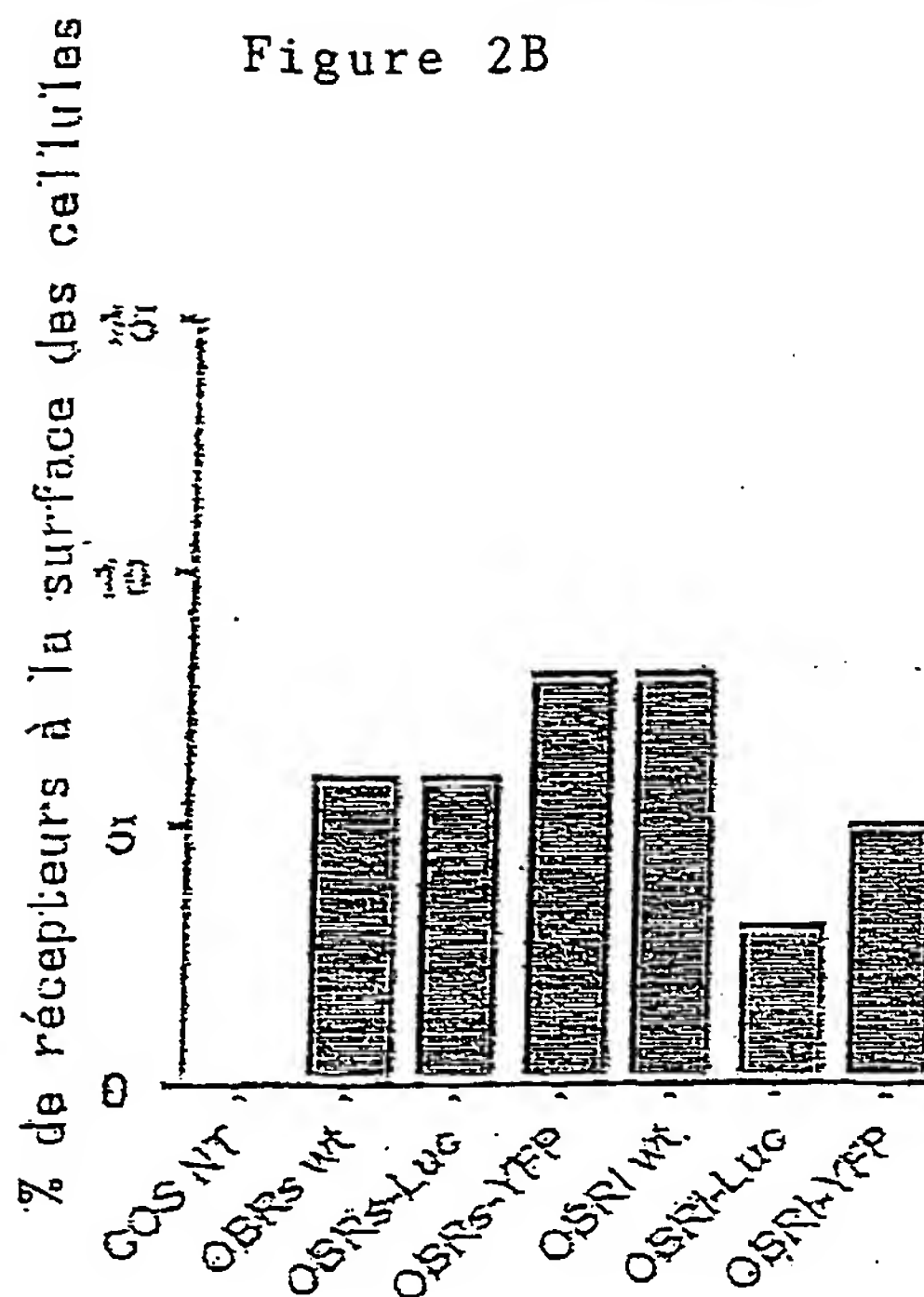


FIGURE 2C

OBRI-YFP



- Lep

+ Lep

OBRs-YFP



- Lep

+ Lep

FIGURE 2D

IP: JAK2
IB: P-Y

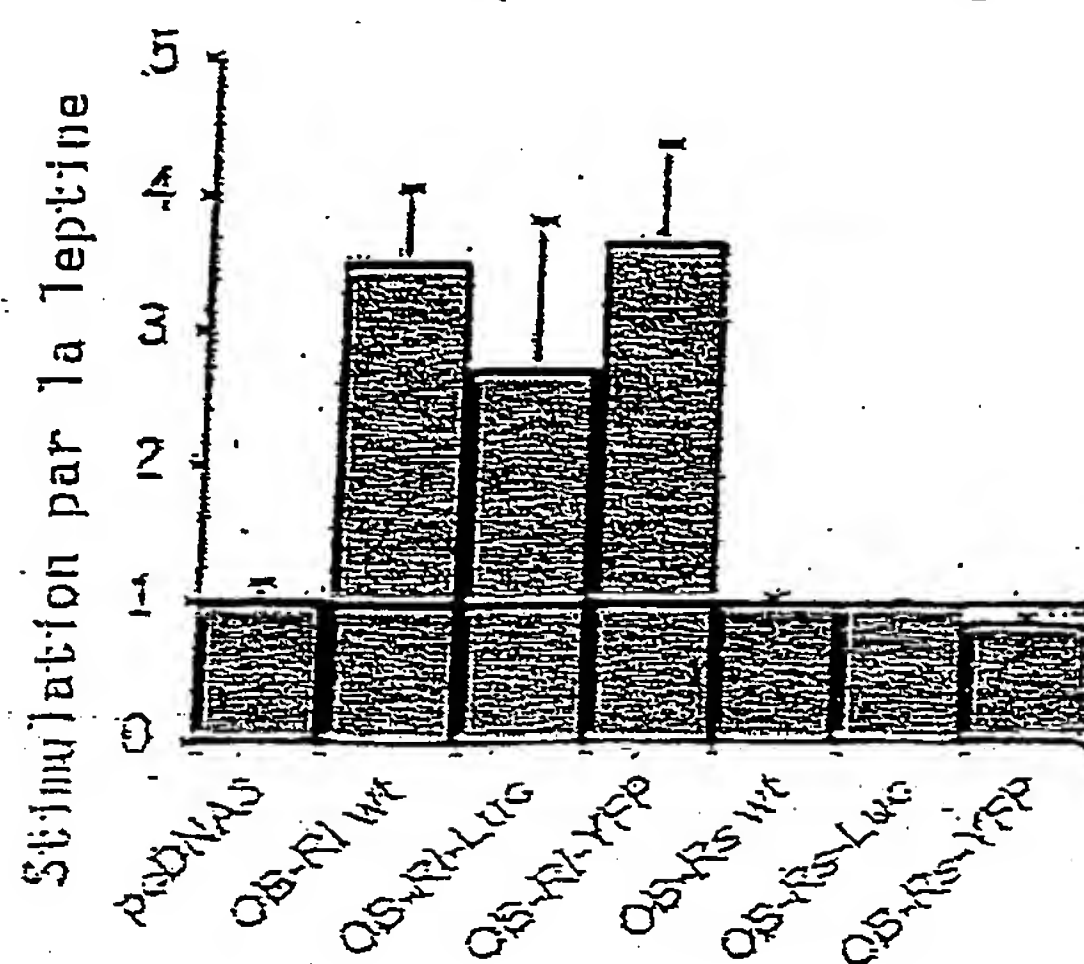
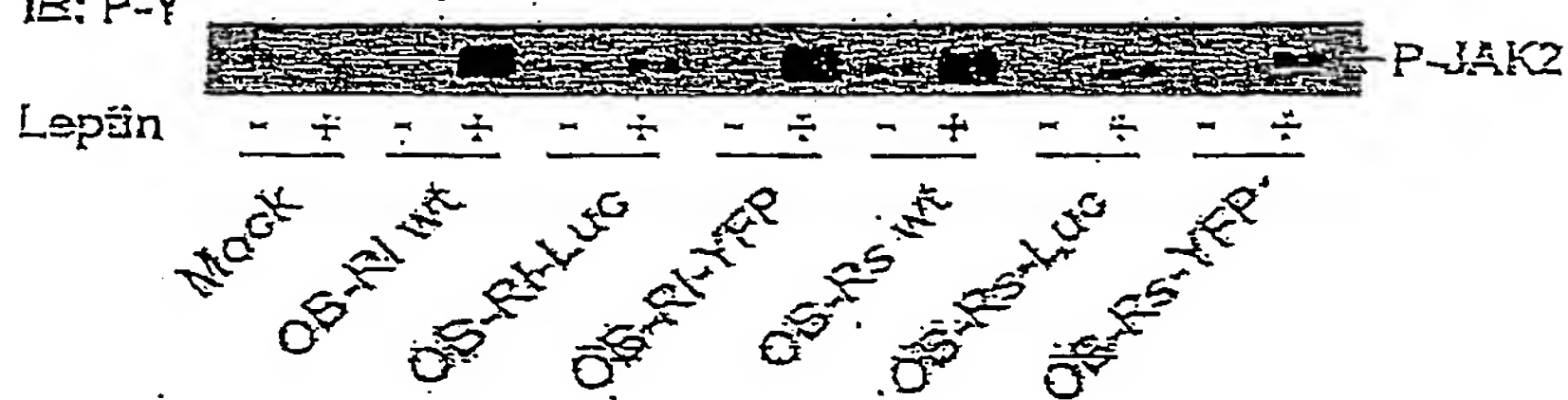
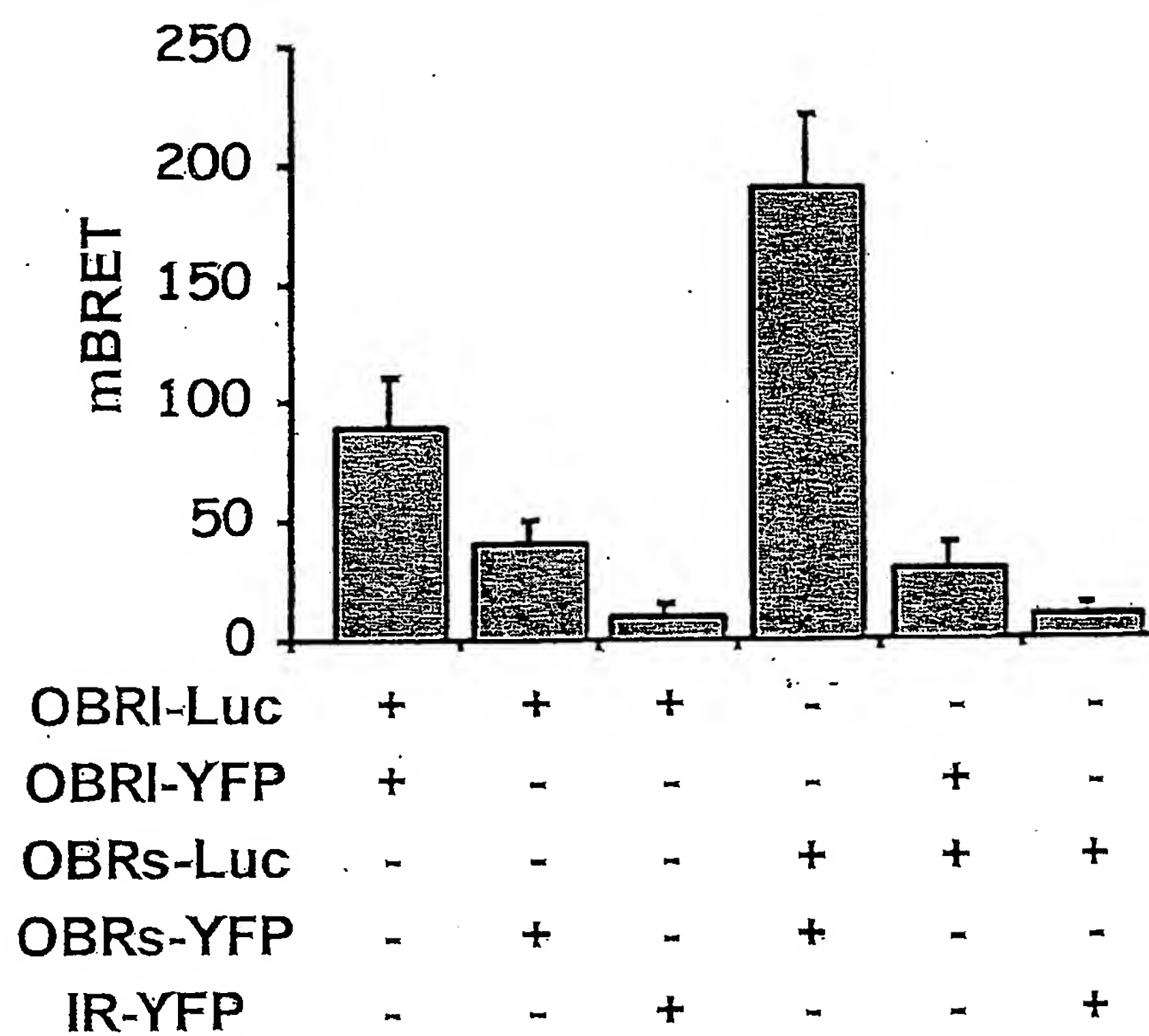


FIGURE 2E

Figure 3



4/6

FIGURE 4A

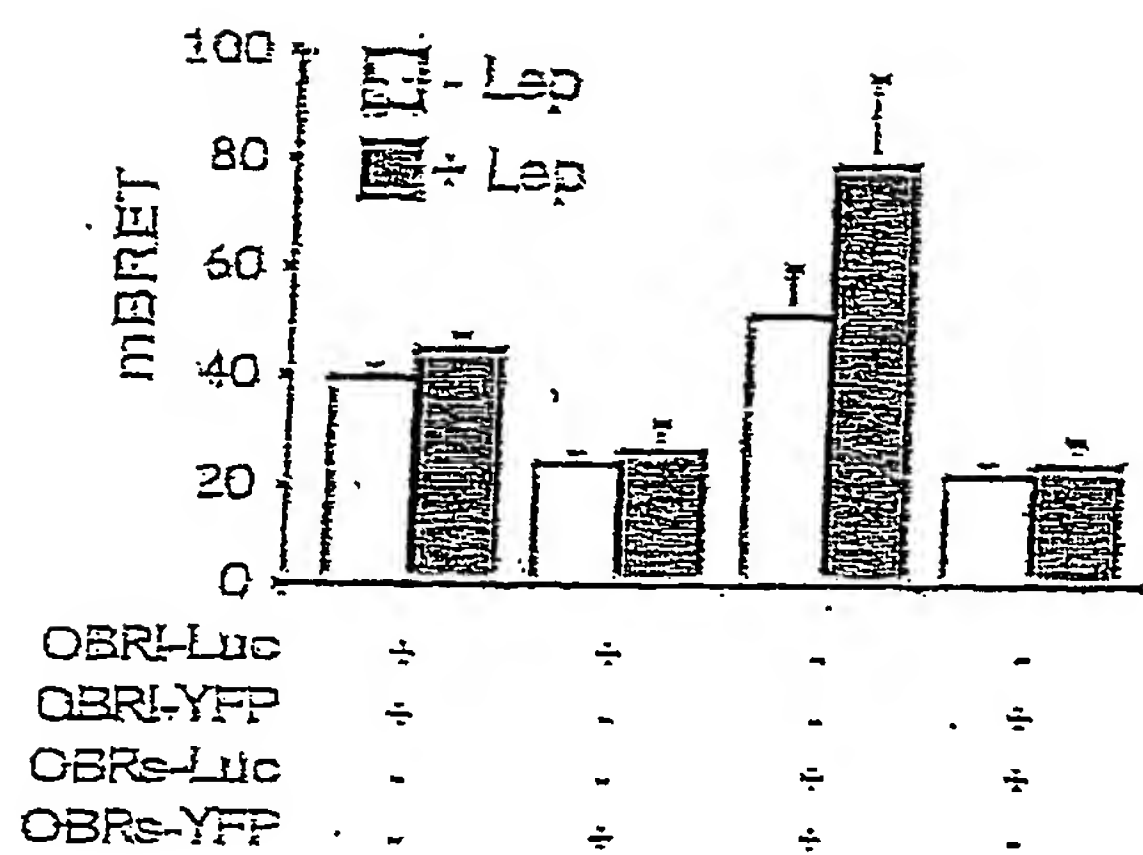


FIGURE 4B

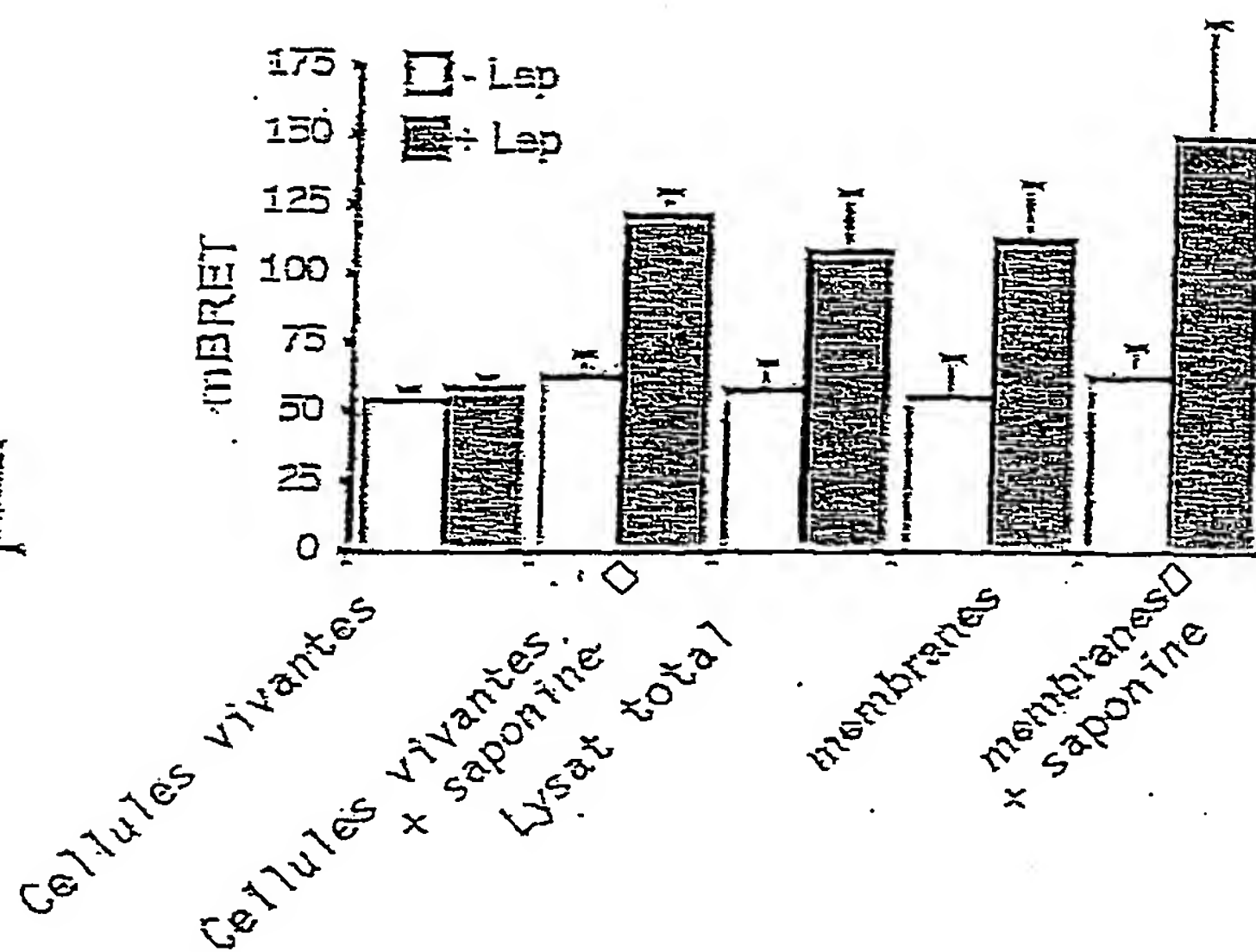


FIGURE 5A

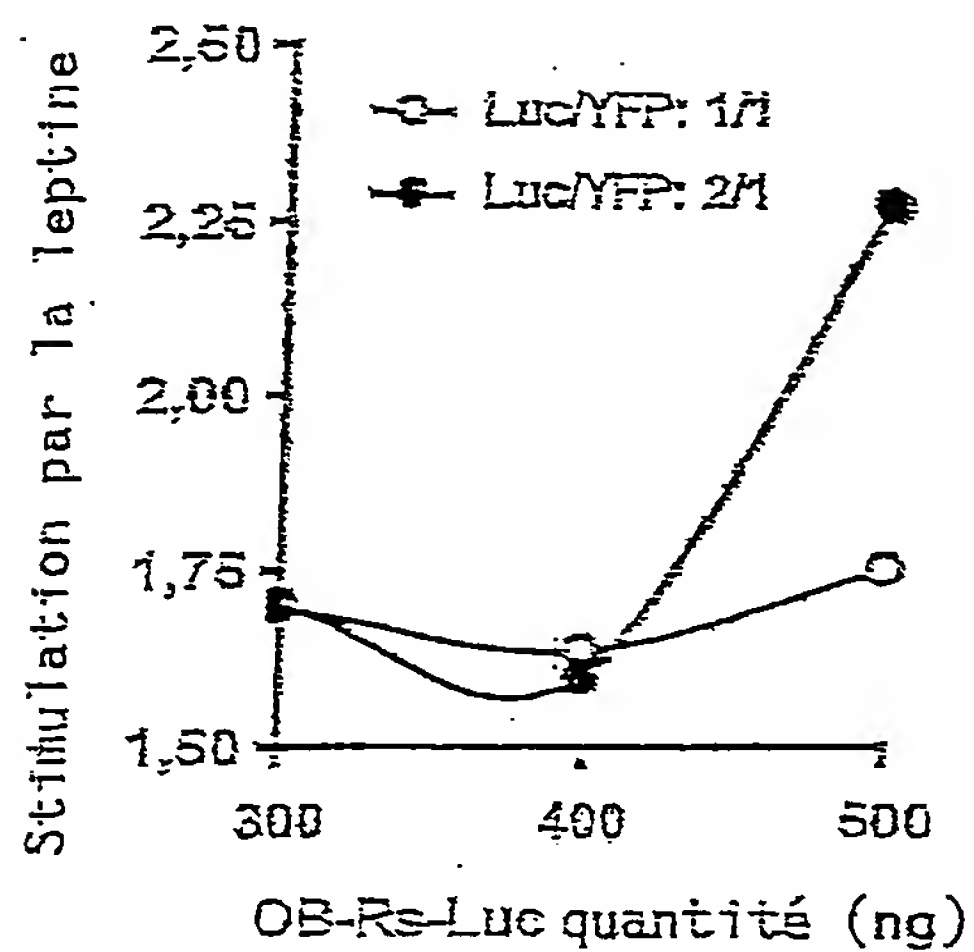


FIGURE 5B

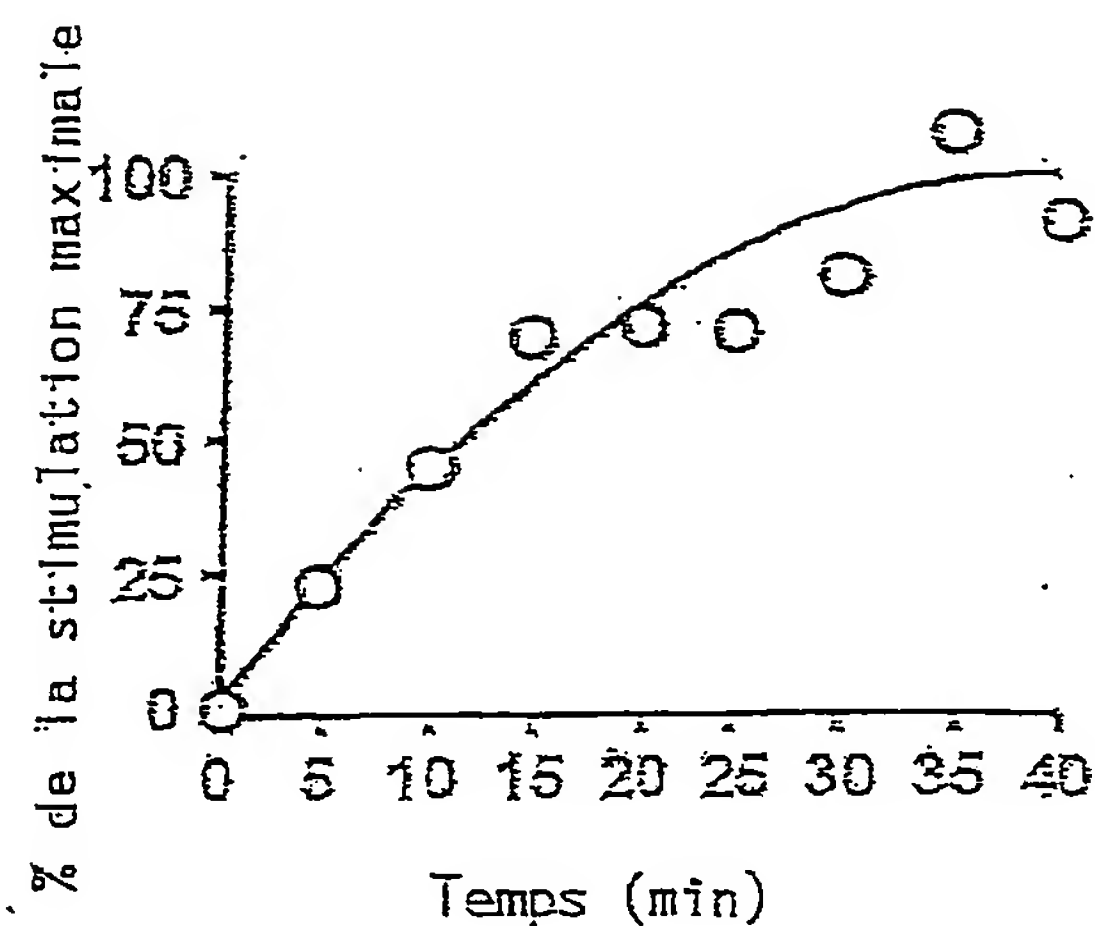


FIGURE 5C

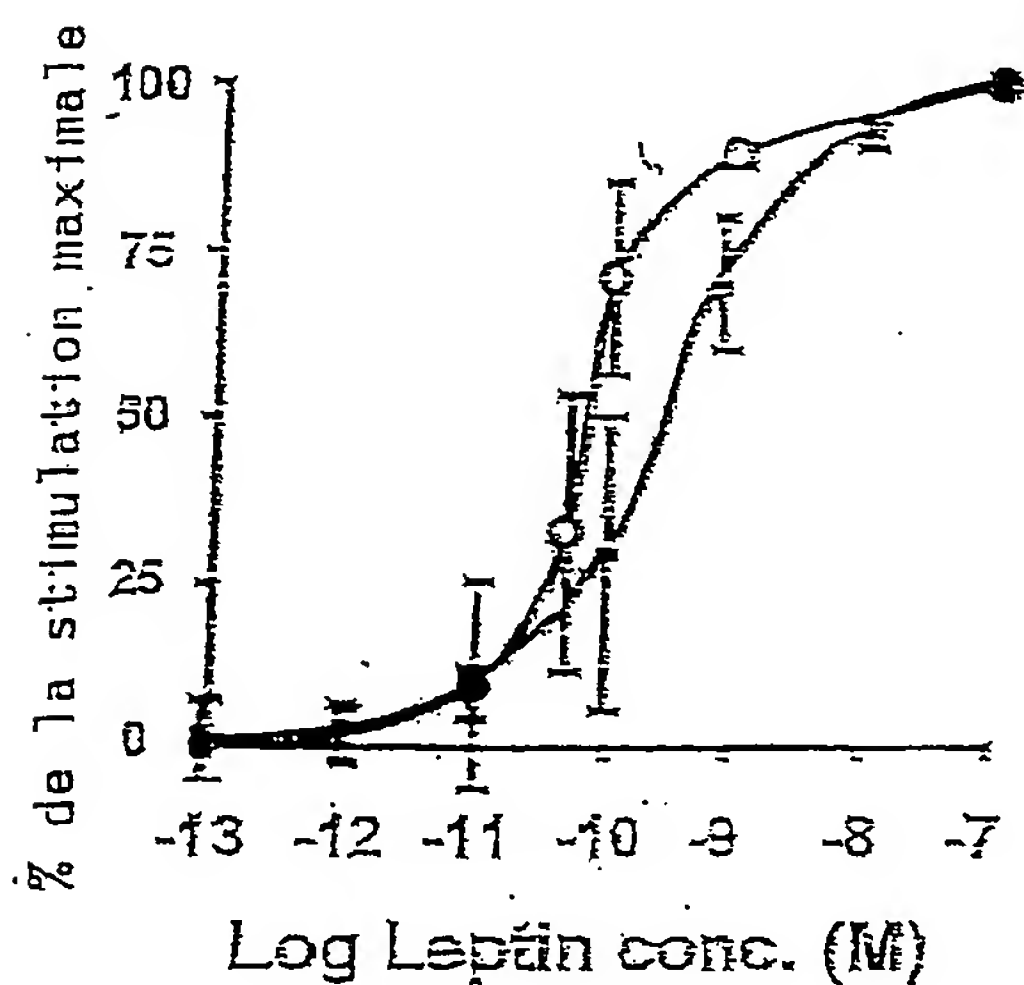


FIGURE 5D

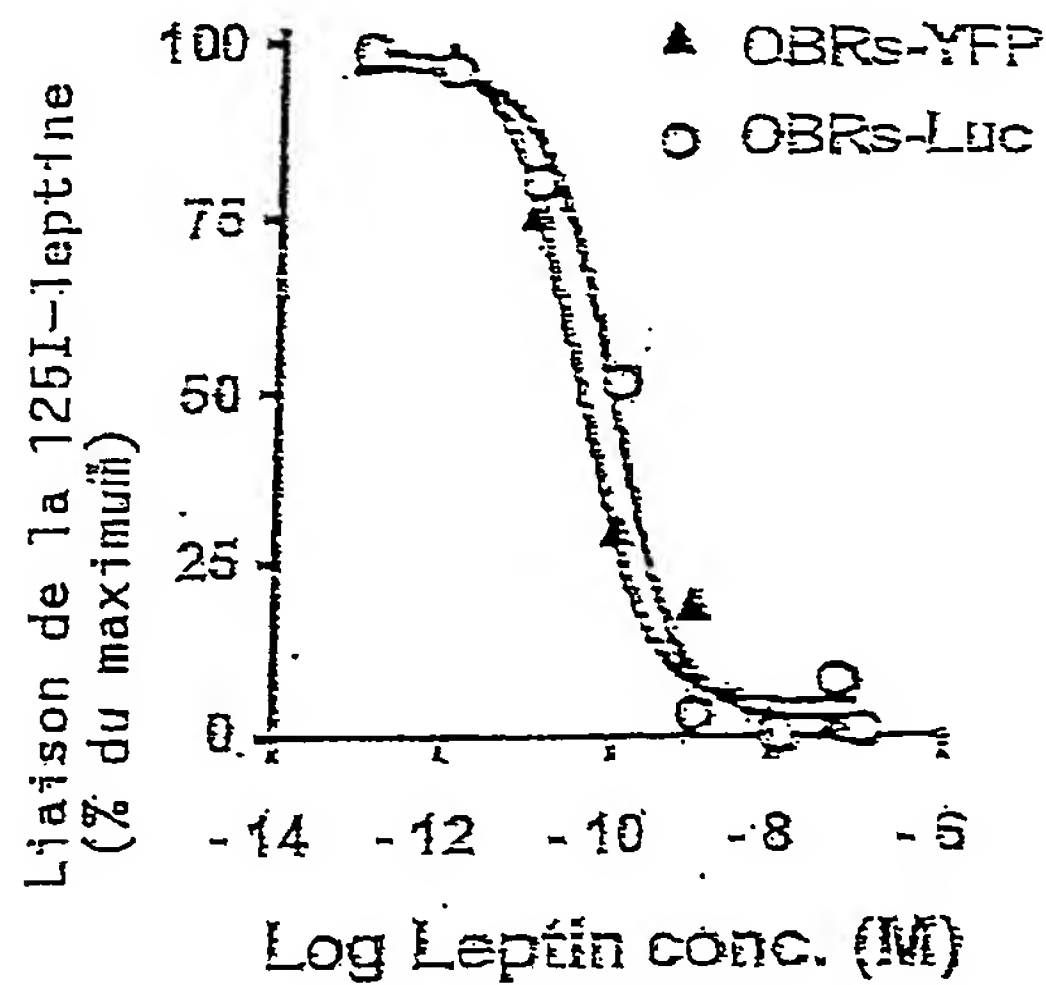
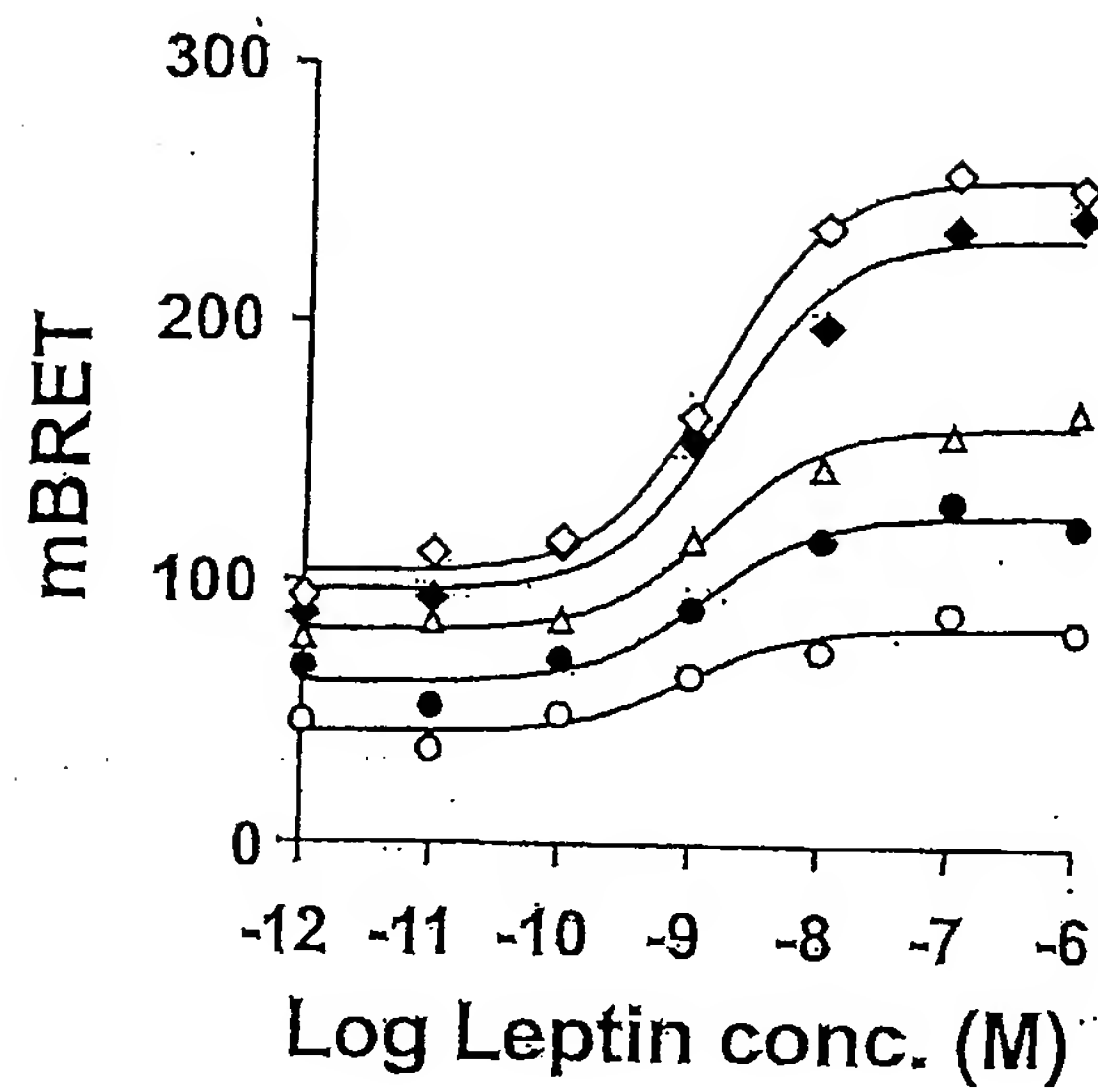


FIGURE 5E



6/6

Figure 6



LISTE DE SEQUENCES

<110> AVENTIS PHARMA S.A.
INSERM

<120> Procédé de criblage d'agonistes et d'antagonistes de la leptine

<130> RecepteurLeptineBRET

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2691

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (2691)

<400> 1

atg att tgt caa aaa ttc tgt gtg gtt ttg tta cat tgg gaa ttt att	48
Met Ile Cys Gln Lys Phe Cys Val Val Leu Leu His Trp Glu Phe Ile	
1 5 10 15	
tat gtg ata act gcg ttt aac ttg tca tat cca att act cct tgg aga	96
Tyr Val Ile Thr Ala Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg	
20 25 30	
ttt aag ttg tct tgc atg cca cca aat tca acc tat gac tac ttc ctt	144
Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu	
35 40 45	
ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg aat gga cat tat	192
Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr	
50 55 60	
gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt act cac ttt tct	240
Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser	
65 70 75 80	
aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cgg agt gag caa gat	288
Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp	
85 90 95	
aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga aag aca ttt gtt	336
Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val	
100 105 110	
tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat gca aac tgg aac	384
Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn	
115 120 125	
ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc atc tgt tat gtg	432
Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val	

130	135	140	
gag tca tta ttt aag aat cta ttc agg aat tat aac tat aag gtc cat			480
Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His			
145	150	155	160
ctt tta tat gtt ctg cct gaa gtg tta gaa gat tca cct ctg gtt ccc			528
Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro			
	165	170	175
caa aaa ggc agt ttt cag atg gtt cac tgc aat tgc agt gtt cat gaa			576
Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu			
	180	185	190
tgt tgt gaa tgt ctt gtg cct gtg cca aca gcc aaa ctc aac gac act			624
Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr			
	195	200	205
ctc ctt atg tgt ttg aaa atc aca tct ggt gga gta att ttc cag tca			672
Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser			
	210	215	220
cct cta atg tca gtt cag ccc ata aat atg gtg aag cct gat cca cca			720
Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro			
	225	230	235
tta ggt ttg cat atg gaa atc aca gat gat ggt aat tta aag att tct			768
Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser			
	245	250	255
tgg tcc agc cca cca ttg gta cca ttt cca ctt caa tat caa gtg aaa			816
Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys			
	260	265	270
tat tca gag aat tct aca aca gtt atc aga gaa gct gac aag att gtc			864
Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val			
	275	280	285
tca gct aca tcc ctg cta gta gac agt ata ctt cct ggg tct tcg tat			912
Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr			
	290	295	300
gag gtt cag gtg agg ggc aag aga ctg gat ggc cca gga atc tgg agt			960
Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser			
	305	310	315
gac tgg agt act cct cgt gtc ttt acc aca caa gat gtc ata tac ttt			1008
Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe			
	325	330	335
cca cct aaa att ctg aca agt gtt ggg tct aat gtt tct ttt cac tgc			1056
Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys			
	340	345	350
atc tat aag aag gaa aac aag att gtt ccc tca aaa gag att gtt tgg			1104
Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp			
	355	360	365
tgg atg aat tta gct gag aaa att cct caa agc cag tat gat gtt gtg			1152
Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val			
	370	375	380

agt gat cat gtt agc aaa gtt act ttt ttc aat ctg aat gaa acc aaa	1200
Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys	
385 390 395 400	
cct cga gga aag ttt acc tat gat gca gtg tac tgc tgc aat gaa cat	1248
Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His	
405 410 415	
gaa tgc cat cat cgc tat gct gaa tta tat gtg att gat gtc aat atc	1296
Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile	
420 425 430	
aat atc tca tgt gaa act gat ggg tac tta act aaa atg act tgc aga	1344
Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg	
435 440 445	
tgg tca acc agt aca atc cag tca ctt gcg gaa agc act ttg caa ttg	1392
Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu	
450 455 460	
agg tat cat agg agc agc ctt tac tgt tct gat att cca tct att cat	1440
Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His	
465 470 475 480	
ccc ata tct gag ccc aaa gat tgc tat ttg cag agt gat ggt ttt tat	1488
Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr	
485 490 495	
gaa tgc att ttc cag cca atc ttc cta tta tct ggc tac aca atg tgg	1536
Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp	
500 505 510	
att agg atc aat cac tct cta ggt tca ctt gac tct cca cca aca tgt	1584
Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys	
515 520 525	
gtc ctt cct gat tct gtg gtg aag cca ctg cct cca tcc agt gtg aaa	1632
Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys	
530 535 540	
gca gaa att act ata aac att gga tta ttg aaa ata tct tgg gaa aag	1680
Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys	
545 550 555 560	
cca gtc ttt cca gag aat aac ctt caa ttc cag att cgc tat ggt tta	1728
Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu	
565 570 575	
agt gga aaa gaa gta caa tgg aag atg tat gag gtt tat gat gca aaa	1776
Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys	
580 585 590	
tca aaa tct gtc agt ctc cca gtt cca gac ttg tgt gca gtc tat gct	1824
Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala	
595 600 605	
gtt cag gtg cgc tgt aag agg cta gat gga ctg gga tat tgg agt aat	1872
Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn	
610 615 620	

tgg agc aat cca gcc tac aca gtt gtc atg gat ata aaa gtt cct atg	1920
Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met	
625 630 635 640	
aga gga cct gaa ttt tgg aga ata att aat gga gat act atg aaa aag	1968
Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys	
645 650 655	
gag aaa aat gtc act tta ctt tgg aag ccc ctg atg aaa aat gac tca	2016
Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser	
660 665 670	
ttg tgc agt gtt cag aga tat gtg ata aac cat cat act tcc tgc aat	2064
Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn	
675 680 685	
gga aca tgg tca gaa gat gtg gga aat cac acg aaa ttc act ttc ctg	2112
Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu	
690 695 700	
tgg aca gag caa gca cat act gtt acg gtt ctg gcc atc aat tca att	2160
Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile	
705 710 715 720	
ggg gct tct gtt gca aat ttt aat tta acc ttt tca tgg cct atg agc	2208
Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser	
725 730 735	
aaa gta aat atc gtg cag tca ctc agt gct tat cct tta aac agc agt	2256
Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser	
740 745 750	
tgt gtg att gtt tcc tgg ata cta tca ccc agt gat tac aag cta atg	2304
Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met	
755 760 765	
tat ttt att att gag tgg aaa aat ctt aat gaa gat ggt gaa ata aaa	2352
Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys	
770 775 780	
tgg ctt aga atc tct tca tct gtt aag aag tat tat atc cat gat cat	2400
Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His	
785 790 795 800	
ttt atc ccc att gag aag tac cag ttc agt ctt tac cca ata ttt atg	2448
Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met	
805 810 815	
gaa gga gtg gga aaa cca aag ata att aat agt ttc act caa gat gat	2496
Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp	
820 825 830	
att gaa aaa cac cag agt gat gca ggt tta tat gta att gtg cca gta	2544
Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val	
835 840 845	
att att tcc tct tcc atc tta ttg ctt gga aca tta tta ata tca cac	2592
Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His	
850 855 860	
caa aga atg aaa aag cta ttt tgg gaa gat gtt ccg aac ccc aag aat	2640

Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn
865 870 875 880

tgt tcc tgg gca caa gga ctt aat ttt cag aag aga acg gac att ctt 2688
Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg Thr Asp Ile Leu
885 890 895

tga 2691

<210> 2
<211> 896
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Ile Cys Gln Lys Phe Cys Val Val Leu Leu His Trp Glu Phe Ile
1 5 10 15

Tyr Val Ile Thr Ala Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg
20 25 30

Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu
35 40 45

Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr
50 55 60

Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser
65 70 75 80

Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp
85 90 95

Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val
100 105 110

Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn
115 120 125

Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val
130 135 140

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His
145 150 155 160

Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro
165 170 175

Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu
180 185 190

Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr
195 200 205

Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser
210 215 220

Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro
225 230 235 240

Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser
 245 250 255
 Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys
 260 265 270
 Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val
 275 280 285
 Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr
 290 295 300
 Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser
 305 310 315 320
 Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe
 325 330 335
 Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys
 340 345 350
 Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp
 355 360 365
 Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val
 370 375 380
 Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys
 385 390 395 400
 Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His
 405 410 415
 Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile
 420 425 430
 Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg
 435 440 445
 Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu
 450 455 460
 Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His
 465 470 475 480
 Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr
 485 490 495
 Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp
 500 505 510
 Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys
 515 520 525
 Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys
 530 535 540
 Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys
 545 550 555 560

Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu
 565 570 575
 Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys
 580 585 590
 Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala
 595 600 605
 Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn
 610 615 620
 Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met
 625 630 635 640
 Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys
 645 650 655
 Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser
 660 665 670
 Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn
 675 680 685
 Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu
 690 695 700
 Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile
 705 710 715 720
 Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser
 725 730 735
 Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser
 740 745 750
 Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met
 755 760 765
 Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys
 770 775 780
 Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His
 785 790 795 800
 Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met
 805 810 815
 Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp
 820 825 830
 Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val
 835 840 845
 Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His
 850 855 860
 Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn
 865 870 875 880
 Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg Thr Asp Ile Leu

885

890

895

<210> 3
 <211> 2751
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2757)

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:Protéine
 de fusion comprenant une partie d'OBRs

<400> 3
 atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc atc cac acc atg ctg ctc ctg 48
 Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc caa gct tca atc tcg gcg cgc 96
 Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30
 cag gag cag aag ctt atc tcg gag gag gac ctg acg cgt tat cca att 144
 Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
 35 40 45
 act cct tgg aga ttt aag ttg tct tgc atg cca cca aat tca acc tat 192
 Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
 50 55 60
 gac tac ttc ctt ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg 240
 Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser
 65 70 75 80
 aat gga cat tat gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt 288
 Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
 85 90 95
 act cac ttt tct aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cgg 336
 Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
 100 105 110
 agt gag caa gat aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga 384
 Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly
 115 120 125
 acg aca ttt gtt tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat 432
 Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp
 130 135 140
 gca aac tgg aac ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc 480
 Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe
 145 150 155 160
 atc tgt tat gtg gag tca tta ttt aag aat cta ttc agg aat tat aac 528
 Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn
 165 170 175

tat aag gtc cat ctt tta tat gtt ctg cct gaa gtg tta gaa gat tca	576
Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser	
180 185 190	
cct ctg gtt ccc caa aaa ggc agt ttt cag atg gtt cac tgc aat tgc	624
Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys	
195 200 205	
agt gtt cat gaa tgt tgt gaa tgt ctt gtg cct gtg cca aca gcc aaa	672
Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys	
210 215 220	
ctc aac gac act ctc ctt atg tgt ttg aaa atc aca tct ggt gga gta	720
Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val	
225 230 235 240	
att ttc cgg tca cct cta atg tca gtt cag ccc ata aat atg gtg aag	768
Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys	
245 250 255	
cct gat cca cca tta ggt ttg cat atg gaa atc aca gat gat ggt aat	816
Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn	
260 265 270	
tta aag att tct tgg tcc agc cca cca ttg gta cca ttt cca ctt caa	864
Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln	
275 280 285	
tat caa gtg aaa tat tca gag aat tct aca aca gtt atc aga gaa gct	912
Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala	
290 295 300	
gac aag att gtc tca gct aca tcc ctg cta gta gac agt ata ctt cct	960
Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro	
305 310 315 320	
ggg tct tcg tat gag gtt cag gtg agg ggc aag aga ctg gat ggc cca	1008
Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro	
325 330 335	
gga atc tgg agt gac tgg agt act cct cgt gtc ttt acc aca caa gat	1056
Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp	
340 345 350	
gtc ata tac ttt cca cct aaa att ctg aca agt gtt ggg tct aat gtt	1104
Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val	
355 360 365	
tct ttt cac tgc atc tat aag aag gaa aac aag att gtt ccc tca aaa	1152
Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys	
370 375 380	
gag att gtt tgg tgg atg aat tta gct gag aaa att cct caa agc cag	1200
Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln	
385 390 395 400	
tat gat gtt gtg agt gat cat gtt agc aaa gtt act ttt ttc aat ctg	1248
Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu	
405 410 415	

aat gaa acc aaa cct cga gga aag ttt acc tat gat gca gtg tac tgc	1296
Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys	
420 425 430	
tgc aat gaa cat gaa tgc cat cat cgc tat gct gaa tta tat gtg att	1344
Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile	
435 440 445	
gat gtc aat atc aat atc tca tgt gaa act gat ggg tac tta act aaa	1392
Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys	
450 455 460	
atg act tgc aga tgg tca acc agt aca atc cag tca ctt gcg gaa agc	1440
Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser	
465 470 475 480	
act ttg caa ttg agg tat cat agg agc agc ctt tac tgt tct gat att	1488
Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile	
485 490 495	
cca tct att cat ccc ata tct gag ccc aaa gat tgc tat ttg cag agt	1536
Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser	
500 505 510	
gat ggt ttt tat gaa tgc att ttc cag cca atc ttc cta tta tct ggc	1584
Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly	
515 520 525	
tac aca atg tgg att agg atc aat cac tct cta ggt tca ctt gac tct	1632
Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser	
530 535 540	
cca cca aca tgt gtc ctt cct gat tct gtg gtg aag cca ctg cct cca	1680
Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro	
545 550 555 560	
tcc agt gtg aaa gca gaa att act ata aac att gga tta ttg aaa ata	1728
Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile	
565 570 575	
tct tgg gaa aag cca gtc ttt cca gag aat aac ctt caa ttc cag att	1776
Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile	
580 585 590	
cgc tat ggt tta agt gga aaa gaa gta caa tgg aag atg tat gag gtt	1824
Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val	
595 600 605	
tat gat gca aaa tca aaa tct gtc agt ctc cca gtt cca gac ttg tgt	1872
Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys	
610 615 620	
gca gtc tat gct gtt cag gtg cgc tgt aag agg cta gat gga ctg gga	1920
Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly	
625 630 635 640	
tat tgg agt aat tgg agc aat cca gcc tac aca gtt gtc atg gat ata	1968
Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile	
645 650 655	
aaa gtt cct atg aga gga cct gaa ttt tgg aga ata att aat gga gat	2016

Lys	Val	Pro	Met	Arg	Gly	Pro	Glu	Phe	Trp	Arg	Ile	Ile	Asn	Gly	Asp		
			660					665					670				
act	atg	aaa	aag	gag	aaa	aat	gtc	act	tta	ctt	tgg	aag	ccc	ctg	atg	2064	
Thr	Met	Lys	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Trp	Lys	Pro	Leu	Met		
		675					680					685					
aaa	aat	gac	tca	ttg	tgc	agt	ggt	cag	aga	tat	gtg	ata	aac	cat	cat	2112	
Lys	Asn	Asp	Ser	Leu	Cys	Ser	Val	Gln	Arg	Tyr	Val	Ile	Asn	His	His		
	690					695					700						
act	tcc	tgc	aat	gga	aca	tgg	tca	gaa	gat	gtg	gga	aat	cac	acg	aaa	2160	
Thr	Ser	Cys	Asn	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu	Asp	Val	Gly	Asn	His	Thr	Lys		
705					710					715					720		
ttc	act	ttc	ctg	tgg	aca	gag	caa	gca	cat	act	gtt	acg	gtt	ctg	gcc	2208	
Phe	Thr	Phe	Leu	Trp	Thr	Glu	Gln	Ala	His	Thr	Val	Thr	Val	Leu	Ala		
				725					730					735			
atc	aat	tca	att	ggg	gct	tct	gtt	gca	aat	ttt	aat	tta	acc	ttt	tca	2256	
Ile	Asn	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Phe	Ser		
			740					745					750				
tgg	cct	atg	agc	aaa	gta	aat	atc	gtg	cag	tca	ctc	agt	gct	tat	cct	2304	
Trp	Pro	Met	Ser	Lys	Val	Asn	Ile	Val	Gln	Ser	Leu	Ser	Ala	Tyr	Pro		
		755					760					765					
tta	aac	agc	agt	tgt	gtg	att	gtt	tcc	tgg	ata	cta	tca	ccc	agt	gat	2352	
Leu	Asn	Ser	Ser	Cys	Val	Ile	Val	Ser	Trp	Ile	Leu	Ser	Pro	Ser	Asp		
	770					775					780						
tac	aag	cta	atg	tat	ttt	att	att	gag	tgg	aaa	aat	ctt	aat	gaa	gat	2400	
Tyr	Lys	Leu	Met	Tyr	Phe	Ile	Ile	Glu	Trp	Lys	Asn	Leu	Asn	Glu	Asp		
785					790					795					800		
ggg	gaa	ata	aaa	tgg	ctt	aga	atc	tct	tca	tct	gtt	aag	aag	tat	tat	2448	
Gly	Glu	Ile	Lys	Trp	Leu	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Val	Lys	Lys	Tyr	Tyr		
				805					810					815			
atc	cat	gat	cat	ttt	atc	ccc	att	gag	aag	tac	cag	ttc	agt	ctt	tac	2496	
Ile	His	Asp	His	Phe	Ile	Pro	Ile	Glu	Lys	Tyr	Gln	Phe	Ser	Leu	Tyr		
			820					825					830				
cca	ata	ttt	atg	gaa	gga	gtg	gga	aaa	cca	aag	ata	att	aat	agt	ttc	2544	
Pro	Ile	Phe	Met	Glu	Gly	Val	Gly	Lys	Pro	Lys	Ile	Ile	Asn	Ser	Phe		
		835					840					845					
act	caa	gat	gat	att	gaa	aaa	cac	cag	agt	gat	gca	ggg	tta	tat	gta	2592	
Thr	Gln	Asp	Asp	Ile	Glu	Lys	His	Gln	Ser	Asp	Ala	Gly	Leu	Tyr	Val		
	850					855					860						
att	gtg	cca	gta	att	att	tcc	tct	tcc	atc	tta	ttg	ctt	gga	aca	tta	2640	
Ile	Val	Pro	Val	Ile	Ile	Ser	Ser	Ser	Ile	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu		
865					870					875					880		
tta	ata	tca	cac	caa	aga	atg	aaa	aag	cta	ttt	tgg	gaa	gat	gtt	ccg	2688	
Leu	Ile	Ser	His	Gln	Arg	Met	Lys	Lys	Leu	Phe	Trp	Glu	Asp	Val	Pro		
				885					890					895			
aac	ccc	aag	aat	tgt	tcc	tgg	gca	caa	gga	ctt	aat	ttt	cag	aag	aga	2736	
Asn	Pro	Lys	Asn	Cys	Ser	Trp	Ala	Gln	Gly	Leu	Asn	Phe	Gln	Lys	Arg		

900

905

910

acg gac att ctt tga
 Thr Asp Ile Leu
 915

2751

<210> 4

<211> 916

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle:Protéine
 de fusion comprenant une partie d'OBRs

<400> 4

Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30

Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
 35 40 45

Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
 50 55 60

Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser
 65 70 75 80

Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
 85 90 95

Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
 100 105 110

Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly
 115 120 125

Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp
 130 135 140

Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe
 145 150 155 160

Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn
 165 170 175

Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser
 180 185 190

Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys
 195 200 205

Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys
 210 215 220

Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val
 225 230 235 240

Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys

245										250					255				
Pro	Asp	Pro	Pro	Leu	Gly	Leu	His	Met	Glu	Ile	Thr	Asp	Asp	Gly	Asn				
			260					265					270						
Leu	Lys	Ile	Ser	Trp	Ser	Ser	Pro	Pro	Leu	Val	Pro	Phe	Pro	Leu	Gln				
		275					280					285							
Tyr	Gln	Val	Lys	Tyr	Ser	Glu	Asn	Ser	Thr	Thr	Val	Ile	Arg	Glu	Ala				
	290					295					300								
Asp	Lys	Ile	Val	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Val	Asp	Ser	Ile	Leu	Pro				
305					310					315					320				
Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Val	Gln	Val	Arg	Gly	Lys	Arg	Leu	Asp	Gly	Pro				
				325					330					335					
Gly	Ile	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Thr	Pro	Arg	Val	Phe	Thr	Thr	Gln	Asp				
			340					345						350					
Val	Ile	Tyr	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Leu	Thr	Ser	Val	Gly	Ser	Asn	Val				
		355					360					365							
Ser	Phe	His	Cys	Ile	Tyr	Lys	Lys	Glu	Asn	Lys	Ile	Val	Pro	Ser	Lys				
	370					375					380								
Glu	Ile	Val	Trp	Trp	Met	Asn	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Pro	Gln	Ser	Gln				
385					390					395					400				
Tyr	Asp	Val	Val	Ser	Asp	His	Val	Ser	Lys	Val	Thr	Phe	Phe	Asn	Leu				
				405					410					415					
Asn	Glu	Thr	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Phe	Thr	Tyr	Asp	Ala	Val	Tyr	Cys				
			420					425					430						
Cys	Asn	Glu	His	Glu	Cys	His	His	Arg	Tyr	Ala	Glu	Leu	Tyr	Val	Ile				
		435					440					445							
Asp	Val	Asn	Ile	Asn	Ile	Ser	Cys	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr	Leu	Thr	Lys				
	450					455					460								
Met	Thr	Cys	Arg	Trp	Ser	Thr	Ser	Thr	Ile	Gln	Ser	Leu	Ala	Glu	Ser				
465					470					475					480				
Thr	Leu	Gln	Leu	Arg	Tyr	His	Arg	Ser	Ser	Leu	Tyr	Cys	Ser	Asp	Ile				
				485					490					495					
Pro	Ser	Ile	His	Pro	Ile	Ser	Glu	Pro	Lys	Asp	Cys	Tyr	Leu	Gln	Ser				
			500					505					510						
Asp	Gly	Phe	Tyr	Glu	Cys	Ile	Phe	Gln	Pro	Ile	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly				
		515					520					525							
Tyr	Thr	Met	Trp	Ile	Arg	Ile	Asn	His	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Asp	Ser				
	530					535					540								
Pro	Pro	Thr	Cys	Val	Leu	Pro	Asp	Ser	Val	Val	Lys	Pro	Leu	Pro	Pro				
545					550					555					560				
Ser	Ser	Val	Lys	Ala	Glu	Ile	Thr	Ile	Asn	Ile	Gly	Leu	Leu	Lys	Ile				
				565					570					575					

Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile
 580 585 590
 Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val
 595 600 605
 Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys
 610 615 620
 Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly
 625 630 635 640
 Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile
 645 650 655
 Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp
 660 665 670
 Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met
 675 680 685
 Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His
 690 695 700
 Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys
 705 710 715 720
 Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala
 725 730 735
 Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser
 740 745 750
 Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro
 755 760 765
 Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp
 770 775 780
 Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp
 785 790 795 800
 Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr
 805 810 815
 Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr
 820 825 830
 Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe
 835 840 845
 Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val
 850 855 860
 Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu
 865 870 875 880
 Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro
 885 890 895

Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg
 900 905 910

Thr Asp Ile Leu
 915

<210> 5

<211> 3705

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
 artificielle:fusionOBRluc

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3705)

<400> 5

atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc atc cac acc atg ctg ctc ctg 48
 Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
 1 5 10 15

ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc caa gct tca atc tcg gcg cgc 96
 Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30

cag gag cag aag ctt atc tcg gag gag gac ctg acg cgt tat cca att 144
 Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
 35 40 45

act cct tgg aga ttt aag ttg tct tgc atg cca cca aat tca acc tat 192
 Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
 50 55 60

gac tac ttc ctt ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg 240
 Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser
 65 70 75 80

aat gga cat tat gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt 288
 Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
 85 90 95

act cac ttt tct aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cgg 336
 Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
 100 105 110

agt gag caa gat aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga 384
 Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly
 115 120 125

acg aca ttt gtt tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat 432
 Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp
 130 135 140

gca aac tgg aac ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc 480
 Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe
 145 150 155 160

atc	tgt	tat	gtg	gag	tca	tta	ttt	aag	aat	cta	ttc	agg	aat	tat	aac	528
Ile	Cys	Tyr	Val	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Leu	Phe	Arg	Asn	Tyr	Asn	
			165						170						175	
tat	aag	gtc	cat	ctt	tta	tat	gtt	ctg	cct	gaa	gtg	tta	gaa	gat	tca	576
Tyr	Lys	Val	His	Leu	Leu	Tyr	Val	Leu	Pro	Glu	Val	Leu	Glu	Asp	Ser	
			180					185							190	
cct	ctg	gtt	ccc	caa	aaa	ggc	agt	ttt	cag	atg	gtt	cac	tgc	aat	tgc	624
Pro	Leu	Val	Pro	Gln	Lys	Gly	Ser	Phe	Gln	Met	Val	His	Cys	Asn	Cys	
		195					200					205				
agt	gtt	cat	gaa	tgt	tgt	gaa	tgt	ctt	gtg	cct	gtg	cca	aca	gcc	aaa	672
Ser	Val	His	Glu	Cys	Cys	Glu	Cys	Leu	Val	Pro	Val	Pro	Thr	Ala	Lys	
	210					215					220					
ctc	aac	gac	act	ctc	ctt	atg	tgt	ttg	aaa	atc	aca	tct	ggg	gga	gta	720
Leu	Asn	Asp	Thr	Leu	Leu	Met	Cys	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Val	
225					230					235					240	
att	ttc	cgg	tca	cct	cta	atg	tca	gtt	cag	ccc	ata	aat	atg	gtg	aag	768
Ile	Phe	Arg	Ser	Pro	Leu	Met	Ser	Val	Gln	Pro	Ile	Asn	Met	Val	Lys	
			245						250					255		
cct	gat	cca	cca	tta	ggg	ttg	cat	atg	gaa	atc	aca	gat	gat	ggg	aat	816
Pro	Asp	Pro	Pro	Leu	Gly	Leu	His	Met	Glu	Ile	Thr	Asp	Asp	Gly	Asn	
			260					265						270		
tta	aag	att	tct	tgg	tcc	agc	cca	cca	ttg	gta	cca	ttt	cca	ctt	caa	864
Leu	Lys	Ile	Ser	Trp	Ser	Ser	Pro	Pro	Leu	Val	Pro	Phe	Pro	Leu	Gln	
		275					280					285				
tat	caa	gtg	aaa	tat	tca	gag	aat	tct	aca	aca	gtt	atc	aga	gaa	gct	912
Tyr	Gln	Val	Lys	Tyr	Ser	Glu	Asn	Ser	Thr	Thr	Val	Ile	Arg	Glu	Ala	
	290					295					300					
gac	aag	att	gtc	tca	gct	aca	tcc	ctg	cta	gta	gac	agt	ata	ctt	cct	960
Asp	Lys	Ile	Val	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Val	Asp	Ser	Ile	Leu	Pro	
305					310					315					320	
ggg	tct	tcg	tat	gag	gtt	cag	gtg	agg	ggc	aag	aga	ctg	gat	ggc	cca	1008
Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Val	Gln	Val	Arg	Gly	Lys	Arg	Leu	Asp	Gly	Pro	
			325					330						335		
gga	atc	tgg	agt	gac	tgg	agt	act	cct	cgt	gtc	ttt	acc	aca	caa	gat	1056
Gly	Ile	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Thr	Pro	Arg	Val	Phe	Thr	Thr	Gln	Asp	
			340					345					350			
gtc	ata	tac	ttt	cca	cct	aaa	att	ctg	aca	agt	gtt	ggg	tct	aat	gtt	1104
Val	Ile	Tyr	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Leu	Thr	Ser	Val	Gly	Ser	Asn	Val	
		355					360					365				
tct	ttt	cac	tgc	atc	tat	aag	aag	gaa	aac	aag	att	gtt	ccc	tca	aaa	1152
Ser	Phe	His	Cys	Ile	Tyr	Lys	Lys	Glu	Asn	Lys	Ile	Val	Pro	Ser	Lys	
	370					375					380					
gag	att	gtt	tgg	tgg	atg	aat	tta	gct	gag	aaa	att	cct	caa	agc	cag	1200
Glu	Ile	Val	Trp	Trp	Met	Asn	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Pro	Gln	Ser	Gln	
385					390					395					400	

tat gat gtt gtg agt gat cat gtt agc aaa gtt act ttt ttc aat ctg	1248
Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu	
405 410 415	
aat gaa acc aaa cct cga gga aag ttt acc tat gat gca gtg tac tgc	1296
Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys	
420 425 430	
tgc aat gaa cat gaa tgc cat cat cgc tat gct gaa tta tat gtg att	1344
Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile	
435 440 445	
gat gtc aat atc aat atc tca tgt gaa act gat ggg tac tta act aaa	1392
Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys	
450 455 460	
atg act tgc aga tgg tca acc agt aca atc cag tca ctt gcg gaa agc	1440
Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser	
465 470 475 480	
act ttg caa ttg agg tat cat agg agc agc ctt tac tgt tct gat att	1488
Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile	
485 490 495	
cca tct att cat ccc ata tct gag ccc aaa gat tgc tat ttg cag agt	1536
Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser	
500 505 510	
gat ggt ttt tat gaa tgc att ttc cag cca atc ttc cta tta tct ggc	1584
Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly	
515 520 525	
tac aca atg tgg att agg atc aat cac tct cta ggt tca ctt gac tct	1632
Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser	
530 535 540	
cca cca aca tgt gtc ctt cct gat tct gtg gtg aag cca ctg cct cca	1680
Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro	
545 550 555 560	
tcc agt gtg aaa gca gaa att act ata aac att gga tta ttg aaa ata	1728
Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile	
565 570 575	
tct tgg gaa aag cca gtc ttt cca gag aat aac ctt caa ttc cag att	1776
Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile	
580 585 590	
cgc tat ggt tta agt gga aaa gaa gta caa tgg aag atg tat gag gtt	1824
Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val	
595 600 605	
tat gat gca aaa tca aaa tct gtc agt ctc cca gtt cca gac ttg tgt	1872
Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys	
610 615 620	
gca gtc tat gct gtt cag gtg cgc tgt aag agg cta gat gga ctg gga	1920
Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly	
625 630 635 640	
tat tgg agt aat tgg agc aat cca gcc tac aca gtt gtc atg gat ata	1968

Tyr	Trp	Ser	Asn	Trp	Ser	Asn	Pro	Ala	Tyr	Thr	Val	Val	Met	Asp	Ile	
				645					650					655		
aaa	gtt	cct	atg	aga	gga	cct	gaa	ttt	tgg	aga	ata	att	aat	gga	gat	2016
Lys	Val	Pro	Met	Arg	Gly	Pro	Glu	Phe	Trp	Arg	Ile	Ile	Asn	Gly	Asp	
			660					665					670			
act	atg	aaa	aag	gag	aaa	aat	gtc	act	tta	ctt	tgg	aag	ccc	ctg	atg	2064
Thr	Met	Lys	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Trp	Lys	Pro	Leu	Met	
			675				680					685				
aaa	aat	gac	tca	ttg	tgc	agt	gtt	cag	aga	tat	gtg	ata	aac	cat	cat	2112
Lys	Asn	Asp	Ser	Leu	Cys	Ser	Val	Gln	Arg	Tyr	Val	Ile	Asn	His	His	
	690					695					700					
act	tcc	tgc	aat	gga	aca	tgg	tca	gaa	gat	gtg	gga	aat	cac	acg	aaa	2160
Thr	Ser	Cys	Asn	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu	Asp	Val	Gly	Asn	His	Thr	Lys	
	705				710					715					720	
ttc	act	ttc	ctg	tgg	aca	gag	caa	gca	cat	act	gtt	acg	gtt	ctg	gcc	2208
Phe	Thr	Phe	Leu	Trp	Thr	Glu	Gln	Ala	His	Thr	Val	Thr	Val	Leu	Ala	
			725						730					735		
atc	aat	tca	att	ggt	gct	tct	gtt	gca	aat	ttt	aat	tta	acc	ttt	tca	2256
Ile	Asn	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Phe	Ser	
			740					745					750			
tgg	cct	atg	agc	aaa	gta	aat	atc	gtg	cag	tca	ctc	agt	gct	tat	cct	2304
Trp	Pro	Met	Ser	Lys	Val	Asn	Ile	Val	Gln	Ser	Leu	Ser	Ala	Tyr	Pro	
		755					760					765				
tta	aac	agc	agt	tgt	gtg	att	gtt	tcc	tgg	ata	cta	tca	ccc	agt	gat	2352
Leu	Asn	Ser	Ser	Cys	Val	Ile	Val	Ser	Trp	Ile	Leu	Ser	Pro	Ser	Asp	
	770					775					780					
tac	aag	cta	atg	tat	ttt	att	att	gag	tgg	aaa	aat	ctt	aat	gaa	gat	2400
Tyr	Lys	Leu	Met	Tyr	Phe	Ile	Ile	Glu	Trp	Lys	Asn	Leu	Asn	Glu	Asp	
	785				790					795				800		
ggt	gaa	ata	aaa	tgg	ctt	aga	atc	tct	tca	tct	gtt	aag	aag	tat	tat	2448
Gly	Glu	Ile	Lys	Trp	Leu	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Val	Lys	Lys	Tyr	Tyr	
			805					810						815		
atc	cat	gat	cat	ttt	atc	ccc	att	gag	aag	tac	cag	ttc	agt	ctt	tac	2496
Ile	His	Asp	His	Phe	Ile	Pro	Ile	Glu	Lys	Tyr	Gln	Phe	Ser	Leu	Tyr	
			820					825					830			
cca	ata	ttt	atg	gaa	gga	gtg	gga	aaa	cca	aag	ata	att	aat	agt	ttc	2544
Pro	Ile	Phe	Met	Glu	Gly	Val	Gly	Lys	Pro	Lys	Ile	Ile	Asn	Ser	Phe	
		835					840					845				
act	caa	gat	gat	att	gaa	aaa	cac	cag	agt	gat	gca	ggt	tta	tat	gta	2592
Thr	Gln	Asp	Asp	Ile	Glu	Lys	His	Gln	Ser	Asp	Ala	Gly	Leu	Tyr	Val	
	850					855					860					
att	gtg	cca	gta	att	att	tcc	tct	tcc	atc	tta	ttg	ctt	gga	aca	tta	2640
Ile	Val	Pro	Val	Ile	Ile	Ser	Ser	Ser	Ile	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	
	865				870					875					880	
tta	ata	tca	cac	caa	aga	atg	aaa	aag	cta	ttt	tgg	gaa	gat	gtt	ccg	2688
Leu	Ile	Ser	His	Gln	Arg	Met	Lys	Lys	Leu	Phe	Trp	Glu	Asp	Val	Pro	

19/33

885								890								895															
aac	ccc	aag	aat	tgt	tcc	tgg	gca	caa	gga	ctt	aat	ttt	cag	aag	aga	2736															
Asn	Pro	Lys	Asn	Cys	Ser	Trp	Ala	Gln	Gly	Leu	Asn	Phe	Gln	Lys	Arg																
900								905								910															
acg	gac	att	ctg	gat	cca	ccg	gct	aga	gcc	acc	atg	acc	agc	aag	gtg	2784															
Thr	Asp	Ile	Leu	Asp	Pro	Pro	Ala	Arg	Ala	Thr	Met	Thr	Ser	Lys	Val																
915								920								925															
tac	gac	ccc	gag	cag	agg	aag	agg	atg	atc	acc	ggc	ccc	cag	tgg	tgg	2832															
Tyr	Asp	Pro	Glu	Gln	Arg	Lys	Arg	Met	Ile	Thr	Gly	Pro	Gln	Trp	Trp																
930								935								940															
gcc	agg	tgc	aag	cag	atg	aac	gtg	ctg	gac	agc	ttc	atc	aac	tac	tac	2880															
Ala	Arg	Cys	Lys	Gln	Met	Asn	Val	Leu	Asp	Ser	Phe	Ile	Asn	Tyr	Tyr																
945								950								955								960							
gac	agc	gag	aag	cac	gcc	gag	aac	gcc	gtg	atc	ttc	ctg	cac	ggc	aac	2928															
Asp	Ser	Glu	Lys	His	Ala	Glu	Asn	Ala	Val	Ile	Phe	Leu	His	Gly	Asn																
965								970								975															
gcc	gct	agc	agc	tac	ctg	tgg	agg	cac	gtg	gtg	ccc	cac	atc	gag	ccc	2976															
Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Trp	Arg	His	Val	Val	Pro	His	Ile	Glu	Pro																
980								985								990															
gtg	gcc	agg	tgc	atc	atc	ccc	gat	ctg	atc	ggc	atg	ggc	aag	agc	ggc	3024															
Val	Ala	Arg	Cys	Ile	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile	Gly	Met	Gly	Lys	Ser	Gly																
995								1000								1005															
aag	agc	ggc	aac	ggc	agc	tac	agg	ctg	ctg	gac	cac	tac	aag	tac	ctg	3072															
Lys	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Tyr	Arg	Leu	Leu	Asp	His	Tyr	Lys	Tyr	Leu																
1010								1015								1020															
acc	gcc	tgg	ttc	gag	ctc	ctg	aac	ctg	ccc	aag	aag	atc	atc	ttc	gtg	3120															
Thr	Ala	Trp	Phe	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Lys	Ile	Ile	Phe	Val																
1025								1030								1035								1040							
ggc	cac	gac	tgg	ggc	gcc	tgc	ctg	gcc	ttc	cac	tac	agc	tac	gag	cac	3168															
Gly	His	Asp	Trp	Gly	Ala	Cys	Leu	Ala	Phe	His	Tyr	Ser	Tyr	Glu	His																
1045								1050								1055															
cag	gac	aag	atc	aag	gcc	atc	gtg	cac	gcc	gag	agc	gtg	gtg	gac	gtg	3216															
Gln	Asp	Lys	Ile	Lys	Ala	Ile	Val	His	Ala	Glu	Ser	Val	Val	Asp	Val																
1060								1065								1070															
atc	gag	agc	tgg	gac	gag	tgg	cca	gac	atc	gag	gag	gac	atc	gcc	ctg	3264															
Ile	Glu	Ser	Trp	Asp	Glu	Trp	Pro	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ile	Ala	Leu																
1075								1080								1085															
atc	aag	agc	gag	gag	ggc	gag	aag	atg	gtg	ctg	gag	aac	aac	ttc	ttc	3312															
Ile	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Glu	Lys	Met	Val	Leu	Glu	Asn	Asn	Phe	Phe																
1090								1095								1100															
gtg	gag	acc	atg	ctg	ccc	agc	aag	atc	atg	aga	aag	ctg	gag	ccc	gag	3360															
Val	Glu	Thr	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ile	Met	Arg	Lys	Leu	Glu	Pro	Glu																
1105								1110								1115								1120							
gag	ttc	gcc	gcc	tac	ctg	gag	ccc	ttc	aag	gag	aag	ggc	gag	gtg	aga	3408															
Glu	Phe	Ala	Ala	Tyr	Leu	Glu	Pro	Phe	Lys	Glu	Lys	Gly	Glu	Val	Arg																
1125								1130								1135															

aga ccc acc ctg agc tgg ccc aga gag atc ccc ctg gtg aag ggc ggc 3456
 Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly
 1140 1145 1150

aag ccc gac gtg gtg cag atc gtg aga aac tac aac gcc tac ctg aga 3504
 Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg
 1155 1160 1165

gcc agc gac gac ctg ccc aag atg ttc atc gag agc gac ccc ggc ttc 3552
 Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe
 1170 1175 1180

ttc agc aac gcc atc gtg gag ggc gcc aag aag ttc ccc aac acc gag 3600
 Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu
 1185 1190 1195 1200

ttc gtg aag gtg aag ggc ctg cac ttc agc cag gag gac gcc ccc gac 3648
 Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp
 1205 1210 1215

gag atg ggc aag tac atc aag agc ttc gtg gag aga gtg ctg aag aac 3696
 Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn
 1220 1225 1230

gag cag taa 3705
 Glu Gln
 1235

<210> 6
 <211> 1234
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <223> Description de la séquence
 artificielle:fusionOBRluc

<400> 6
 Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30

Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
 35 40 45

Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
 50 55 60

Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser
 65 70 75 80

Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
 85 90 95

Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
 100 105 110

Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly
 115 120 125

Thr	Thr	Phe	Val	Ser	Thr	Val	Asn	Ser	Leu	Val	Phe	Gln	Gln	Ile	Asp
130						135					140				
Ala	Asn	Trp	Asn	Ile	Gln	Cys	Trp	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	Phe
145					150					155					160
Ile	Cys	Tyr	Val	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Leu	Phe	Arg	Asn	Tyr	Asn
				165					170					175	
Tyr	Lys	Val	His	Leu	Leu	Tyr	Val	Leu	Pro	Glu	Val	Leu	Glu	Asp	Ser
			180					185					190		
Pro	Leu	Val	Pro	Gln	Lys	Gly	Ser	Phe	Gln	Met	Val	His	Cys	Asn	Cys
		195					200					205			
Ser	Val	His	Glu	Cys	Cys	Glu	Cys	Leu	Val	Pro	Val	Pro	Thr	Ala	Lys
		210				215					220				
Leu	Asn	Asp	Thr	Leu	Leu	Met	Cys	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Val
225					230					235					240
Ile	Phe	Arg	Ser	Pro	Leu	Met	Ser	Val	Gln	Pro	Ile	Asn	Met	Val	Lys
				245					250					255	
Pro	Asp	Pro	Pro	Leu	Gly	Leu	His	Met	Glu	Ile	Thr	Asp	Asp	Gly	Asn
			260					265					270		
Leu	Lys	Ile	Ser	Trp	Ser	Ser	Pro	Pro	Leu	Val	Pro	Phe	Pro	Leu	Gln
		275					280					285			
Tyr	Gln	Val	Lys	Tyr	Ser	Glu	Asn	Ser	Thr	Thr	Val	Ile	Arg	Glu	Ala
		290				295					300				
Asp	Lys	Ile	Val	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Val	Asp	Ser	Ile	Leu	Pro
305					310					315					320
Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Val	Gln	Val	Arg	Gly	Lys	Arg	Leu	Asp	Gly	Pro
				325					330					335	
Gly	Ile	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Thr	Pro	Arg	Val	Phe	Thr	Thr	Gln	Asp
			340					345					350		
Val	Ile	Tyr	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Leu	Thr	Ser	Val	Gly	Ser	Asn	Val
		355					360					365			
Ser	Phe	His	Cys	Ile	Tyr	Lys	Lys	Glu	Asn	Lys	Ile	Val	Pro	Ser	Lys
		370				375					380				
Glu	Ile	Val	Trp	Trp	Met	Asn	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Pro	Gln	Ser	Gln
385					390					395					400
Tyr	Asp	Val	Val	Ser	Asp	His	Val	Ser	Lys	Val	Thr	Phe	Phe	Asn	Leu
				405					410					415	
Asn	Glu	Thr	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Phe	Thr	Tyr	Asp	Ala	Val	Tyr	Cys
			420					425					430		
Cys	Asn	Glu	His	Glu	Cys	His	His	Arg	Tyr	Ala	Glu	Leu	Tyr	Val	Ile
		435					440					445			

Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys
450 455 460

Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser
465 470 475 480

Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile
485 490 495

Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser
500 505 510

Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly
515 520 525

Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser
530 535 540

Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro
545 550 555 560

Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile
565 570 575

Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile
580 585 590

Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val
595 600 605

Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys
610 615 620

Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly
625 630 635 640

Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile
645 650 655

Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp
660 665 670

Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met
675 680 685

Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His
690 695 700

Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys
705 710 715 720

Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala
725 730 735

Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser
740 745 750

Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro
755 760 765

Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp

770				775				780							
Tyr 785	Lys	Leu	Met	Tyr	Phe 790	Ile	Ile	Glu	Trp	Lys 795	Asn	Leu	Asn	Glu	Asp 800
Gly	Glu	Ile	Lys	Trp 805	Leu	Arg	Ile	Ser	Ser 810	Val	Lys	Lys	Tyr	Tyr 815	
Ile	His	Asp	His 820	Phe	Ile	Pro	Ile	Glu 825	Lys	Tyr	Gln	Phe	Ser 830	Leu	Tyr
Pro	Ile	Phe 835	Met	Glu	Gly	Val	Gly 840	Lys	Pro	Lys	Ile	Ile	Asn	Ser	Phe
Thr	Gln 850	Asp	Asp	Ile	Glu	Lys 855	His	Gln	Ser	Asp	Ala 860	Gly	Leu	Tyr	Val
Ile 865	Val	Pro	Val	Ile	Ile 870	Ser	Ser	Ser	Ile	Leu 875	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu 880
Leu	Ile	Ser	His	Gln 885	Arg	Met	Lys	Lys	Leu 890	Phe	Trp	Glu	Asp	Val	Pro 895
Asn	Pro	Lys	Asn 900	Cys	Ser	Trp	Ala	Gln 905	Gly	Leu	Asn	Phe	Gln 910	Lys	Arg
Thr	Asp 915	Ile	Leu	Asp	Pro	Pro	Ala 920	Arg	Ala	Thr	Met	Thr 925	Ser	Lys	Val
Tyr 930	Asp	Pro	Glu	Gln	Arg	Lys 935	Arg	Met	Ile	Thr	Gly 940	Pro	Gln	Trp	Trp
Ala 945	Arg	Cys	Lys	Gln	Met 950	Asn	Val	Leu	Asp	Ser 955	Phe	Ile	Asn	Tyr	Tyr 960
Asp	Ser	Glu	Lys	His 965	Ala	Glu	Asn	Ala 970	Val	Ile	Phe	Leu	His	Gly 975	Asn
Ala	Ala	Ser	Ser 980	Tyr	Leu	Trp	Arg	His 985	Val	Val	Pro	His	Ile 990	Glu	Pro
Val	Ala	Arg	Cys 995	Ile	Ile	Pro	Asp 1000	Leu	Ile	Gly	Met	Gly 1005	Lys	Ser	Gly
Lys 1010	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Tyr 1015	Arg	Leu	Leu	Asp	His 1020	Tyr	Lys	Tyr	Leu
Thr 1025	Ala	Trp	Phe	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys 1035	Lys	Ile	Ile	Phe	Val 1040
Gly	His	Asp	Trp	Gly 1045	Ala	Cys	Leu	Ala	Phe 1050	His	Tyr	Ser	Tyr	Glu	His 1055
Gln	Asp	Lys	Ile 1060	Lys	Ala	Ile	Val	His 1065	Ala	Glu	Ser	Val	Val	Asp	Val 1070
Ile	Glu	Ser	Trp	Asp	Glu	Trp	Pro	Asp 1080	Ile	Glu	Glu	Asp 1085	Ile	Ala	Leu
Ile 1090	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Glu	Lys	Met	Val	Leu	Glu	Asn	Asn	Phe	Phe 1100

Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu
105 1110 1115 1120

Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg
1125 1130 1135

Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly
1140 1145 1150

Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg
1155 1160 1165

Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe
1170 1175 1180

Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu
185 1190 1195 1200

Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp
1205 1210 1215

Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn
1220 1225 1230

Glu Gln

<210> 7

<211> 3486

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:fusionOBryfp

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3486)

<400> 7

atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc atc cac acc atg ctg ctc ctg 48
Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
1 5 10 15

ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc caa gct tca atc tcg gcg cgc 96
Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
20 25 30

cag gag cag aag ctt atc tcg gag gag gac ctg acg cgt tat cca att 144
Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
35 40 45

act cct tgg aga ttt aag ttg tct tgc atg cca cca aat tca acc tat 192
Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
50 55 60

gac tac ttc ctt ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg 240
Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser

25/33

65	70	75	80	
aat gga cat tat gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt	288			
Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly				
85	90	95		
act cac ttt tct aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cgg	336			
Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg				
100	105	110		
agt gag caa gat aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga	384			
Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly				
115	120	125		
acg aca ttt gtt tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat	432			
Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp				
130	135	140		
gca aac tgg aac ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc	480			
Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe				
145	150	155	160	
atc tgt tat gtg gag tca tta ttt aag aat cta ttc agg aat tat aac	528			
Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn				
165	170	175		
tat aag gtc cat ctt tta tat gtt ctg cct gaa gtg tta gaa gat tca	576			
Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser				
180	185	190		
cct ctg gtt ccc caa aaa ggc agt ttt cag atg gtt cac tgc aat tgc	624			
Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys				
195	200	205		
agt gtt cat gaa tgt tgt gaa tgt ctt gtg cct gtg cca aca gcc aaa	672			
Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys				
210	215	220		
ctc aac gac act ctc ctt atg tgt ttg aaa atc aca tct ggt gga gta	720			
Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val				
225	230	235	240	
att ttc cgg tca cct cta atg tca gtt cag ccc ata aat atg gtg aag	768			
Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys				
245	250	255		
cct gat cca cca tta ggt ttg cat atg gaa atc aca gat gat ggt aat	816			
Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn				
260	265	270		
tta aag att tct tgg tcc agc cca cca ttg gta cca ttt cca ctt caa	864			
Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln				
275	280	285		
tat caa gtg aaa tat tca gag aat tct aca aca gtt atc aga gaa gct	912			
Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala				
290	295	300		
gac aag att gtc tca gct aca tcc ctg cta gta gac agt ata ctt cct	960			
Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro				
305	310	315	320	

ggg tct tcg tat gag gtt cag gtg agg ggc aag aga ctg gat ggc cca	1008
Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro	
325 330 335	
gga atc tgg agt gac tgg agt act cct cgt gtc ttt acc aca caa gat	1056
Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp	
340 345 350	
gtc ata tac ttt cca cct aaa att ctg aca agt gtt ggg tct aat gtt	1104
Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val	
355 360 365	
tct ttt cac tgc atc tat aag aag gaa aac aag att gtt ccc tca aaa	1152
Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys	
370 375 380	
gag att gtt tgg tgg atg aat tta gct gag aaa att cct caa agc cag	1200
Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln	
385 390 395 400	
tat gat gtt gtg agt gat cat gtt agc aaa gtt act ttt ttc aat ctg	1248
Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu	
405 410 415	
aat gaa acc aaa cct cga gga aag ttt acc tat gat gca gtg tac tgc	1296
Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys	
420 425 430	
tgc aat gaa cat gaa tgc cat cat cgc tat gct gaa tta tat gtg att	1344
Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile	
435 440 445	
gat gtc aat atc aat atc tca tgt gaa act gat ggg tac tta act aaa	1392
Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys	
450 455 460	
atg act tgc aga tgg tca acc agt aca atc cag tca ctt gcg gaa agc	1440
Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser	
465 470 475 480	
act ttg caa ttg agg tat cat agg agc agc ctt tac tgt tct gat att	1488
Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile	
485 490 495	
cca tct att cat ccc ata tct gag ccc aaa gat tgc tat ttg cag agt	1536
Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser	
500 505 510	
gat ggt ttt tat gaa tgc att ttc cag cca atc ttc cta tta tct ggc	1584
Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly	
515 520 525	
tac aca atg tgg att agg atc aat cac tct cta ggt tca ctt gac tct	1632
Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser	
530 535 540	
cca cca aca tgt gtc ctt cct gat tct gtg gtg aag cca ctg cct cca	1680
Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro	
545 550 555 560	

tcc agt gtg aaa gca gaa att act ata aac att gga tta ttg aaa ata	1728
Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile	
565 570 575	
tct tgg gaa aag cca gtc ttt cca gag aat aac ctt caa ttc cag att	1776
Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile	
580 585 590	
cgc tat ggt tta agt gga aaa gaa gta caa tgg aag atg tat gag gtt	1824
Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val	
595 600 605	
tat gat gca aaa tca aaa tct gtc agt ctc cca gtt cca gac ttg tgt	1872
Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys	
610 615 620	
gca gtc tat gct gtt cag gtg cgc tgt aag agg cta gat gga ctg gga	1920
Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly	
625 630 635 640	
tat tgg agt aat tgg agc aat cca gcc tac aca gtt gtc atg gat ata	1968
Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile	
645 650 655	
aaa gtt cct atg aga gga cct gaa ttt tgg aga ata att aat gga gat	2016
Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp	
660 665 670	
act atg aaa aag gag aaa aat gtc act tta ctt tgg aag ccc ctg atg	2064
Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met	
675 680 685	
aaa aat gac tca ttg tgc agt gtt cag aga tat gtg ata aac cat cat	2112
Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His	
690 695 700	
act tcc tgc aat gga aca tgg tca gaa gat gtg gga aat cac acg aaa	2160
Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys	
705 710 715 720	
ttc act ttc ctg tgg aca gag caa gca cat act gtt acg gtt ctg gcc	2208
Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala	
725 730 735	
atc aat tca att ggt gct tct gtt gca aat ttt aat tta acc ttt tca	2256
Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser	
740 745 750	
tgg cct atg agc aaa gta aat atc gtg cag tca ctc agt gct tat cct	2304
Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro	
755 760 765	
tta aac agc agt tgt gtg att gtt tcc tgg ata cta tca ccc agt gat	2352
Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp	
770 775 780	
tac aag cta atg tat ttt att att gag tgg aaa aat ctt aat gaa gat	2400
Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp	
785 790 795 800	
ggg gaa ata aaa tgg ctt aga atc tct tca tct gtt aag aag tat tat	2448

Gly	Glu	Ile	Lys	Trp	Leu	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Val	Lys	Lys	Tyr	Tyr		
				805				810						815			
atc	cat	gat	cat	ttt	atc	ccc	att	gag	aag	tac	cag	ttc	agt	ctt	tac		2496
Ile	His	Asp	His	Phe	Ile	Pro	Ile	Glu	Lys	Tyr	Gln	Phe	Ser	Leu	Tyr		
			820					825					830				
cca	ata	ttt	atg	gaa	gga	gtg	gga	aaa	cca	aag	ata	att	aat	agt	ttc		2544
Pro	Ile	Phe	Met	Glu	Gly	Val	Gly	Lys	Pro	Lys	Ile	Ile	Asn	Ser	Phe		
		835					840					845					
act	caa	gat	gat	att	gaa	aaa	cac	cag	agt	gat	gca	ggt	tta	tat	gta		2592
Thr	Gln	Asp	Asp	Ile	Glu	Lys	His	Gln	Ser	Asp	Ala	Gly	Leu	Tyr	Val		
	850					855					860						
att	gtg	cca	gta	att	att	tcc	tct	tcc	atc	tta	ttg	ctt	gga	aca	tta		2640
Ile	Val	Pro	Val	Ile	Ile	Ser	Ser	Ser	Ile	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu		
865					870					875					880		
tta	ata	tca	cac	caa	aga	atg	aaa	aag	cta	ttt	tgg	gaa	gat	gtt	ccg		2688
Leu	Ile	Ser	His	Gln	Arg	Met	Lys	Lys	Leu	Phe	Trp	Glu	Asp	Val	Pro		
			885						890					895			
aac	ccc	aag	aat	tgt	tcc	tgg	gca	caa	gga	ctt	aat	ttt	cag	aag	aga		2736
Asn	Pro	Lys	Asn	Cys	Ser	Trp	Ala	Gln	Gly	Leu	Asn	Phe	Gln	Lys	Arg		
		900						905					910				
acg	gac	att	ctg	gat	cca	ccg	gtc	gcc	acc	atg	gtg	agc	aag	ggc	gag		2784
Thr	Asp	Ile	Leu	Asp	Pro	Pro	Val	Ala	Thr	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu		
	915						920					925					
gag	ctg	ttc	acc	ggg	gtg	gtg	ccc	atc	ctg	gtc	gag	ctg	gac	ggc	gac		2832
Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp		
930						935					940						
gta	aac	ggc	cac	aag	ttc	agc	gtg	tcc	ggc	gag	ggc	gag	ggc	gat	gcc		2880
Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala		
945					950					955					960		
acc	tac	ggc	aag	ctg	acc	ctg	aag	ttc	atc	tgc	acc	acc	ggc	aag	ctg		2928
Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu		
				965					970					975			
ccc	gtg	ccc	tgg	ccc	acc	ctc	gtg	acc	acc	ttc	ggc	tac	ggc	gtg	cag		2976
Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe	Gly	Tyr	Gly	Val	Gln		
			980					985					990				
tgc	ttc	gcc	cgc	tac	ccc	gac	cac	atg	cgc	cag	cac	gac	ttc	ttc	aag		3024
Cys	Phe	Ala	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Arg	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys		
	995						1000					1005					
tcc	gcc	atg	ccc	gaa	ggc	tac	gtc	cag	gag	cgc	acc	atc	ttc	ttc	aag		3072
Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys		
1010						1015				1020							
gac	gac	ggc	aac	tac	aag	acc	cgc	gcc	gag	gtg	aag	ttc	gag	ggc	gac		3120
Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp		
1025					1030				1035					1040			
acc	ctg	gtg	aac	cgc	atc	gag	ctg	aag	ggc	atc	gac	ttc	aag	gag	gac		3168
Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp		

1045	1050	1055	
ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc cac aac			3216
Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn			
1060	1065	1070	
gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg aac ttc			3264
Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe			
1075	1080	1085	
aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac			3312
Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His			
1090	1095	1100	
tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac			3360
Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp			
1105	1110	1115	1120
aac cac tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag			3408
Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu			
1125	1130	1135	
aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc			3456
Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile			
1140	1145	1150	
act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag taa			3486
Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys			
1155	1160		

<210> 8

<211> 1161

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence
artificielle:fusionOBRYfp

<400> 8

Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu			
1	5	10	15
Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg			
20	25	30	
Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile			
35	40	45	
Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr			
50	55	60	
Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser			
65	70	75	80
Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly			
85	90	95	
Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg			
100	105	110	
Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly			

115					120					125					
Thr	Thr	Phe	Val	Ser	Thr	Val	Asn	Ser	Leu	Val	Phe	Gln	Gln	Ile	Asp
130					135					140					
Ala	Asn	Trp	Asn	Ile	Gln	Cys	Trp	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	Phe
145					150					155					160
Ile	Cys	Tyr	Val	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Leu	Phe	Arg	Asn	Tyr	Asn
				165					170					175	
Tyr	Lys	Val	His	Leu	Leu	Tyr	Val	Leu	Pro	Glu	Val	Leu	Glu	Asp	Ser
			180					185					190		
Pro	Leu	Val	Pro	Gln	Lys	Gly	Ser	Phe	Gln	Met	Val	His	Cys	Asn	Cys
			195				200					205			
Ser	Val	His	Glu	Cys	Cys	Glu	Cys	Leu	Val	Pro	Val	Pro	Thr	Ala	Lys
			210			215					220				
Leu	Asn	Asp	Thr	Leu	Leu	Met	Cys	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Val
225				230						235					240
Ile	Phe	Arg	Ser	Pro	Leu	Met	Ser	Val	Gln	Pro	Ile	Asn	Met	Val	Lys
				245					250					255	
Pro	Asp	Pro	Pro	Leu	Gly	Leu	His	Met	Glu	Ile	Thr	Asp	Asp	Gly	Asn
			260				265						270		
Leu	Lys	Ile	Ser	Trp	Ser	Ser	Pro	Pro	Leu	Val	Pro	Phe	Pro	Leu	Gln
			275				280					285			
Tyr	Gln	Val	Lys	Tyr	Ser	Glu	Asn	Ser	Thr	Thr	Val	Ile	Arg	Glu	Ala
	290					295					300				
Asp	Lys	Ile	Val	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Val	Asp	Ser	Ile	Leu	Pro
305					310					315					320
Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Val	Gln	Val	Arg	Gly	Lys	Arg	Leu	Asp	Gly	Pro
				325					330					335	
Gly	Ile	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Thr	Pro	Arg	Val	Phe	Thr	Thr	Gln	Asp
			340					345					350		
Val	Ile	Tyr	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Leu	Thr	Ser	Val	Gly	Ser	Asn	Val
			355				360					365			
Ser	Phe	His	Cys	Ile	Tyr	Lys	Lys	Glu	Asn	Lys	Ile	Val	Pro	Ser	Lys
			370			375					380				
Glu	Ile	Val	Trp	Trp	Met	Asn	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Pro	Gln	Ser	Gln
385				390						395					400
Tyr	Asp	Val	Val	Ser	Asp	His	Val	Ser	Lys	Val	Thr	Phe	Phe	Asn	Leu
				405					410					415	
Asn	Glu	Thr	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Phe	Thr	Tyr	Asp	Ala	Val	Tyr	Cys
			420					425					430		
Cys	Asn	Glu	His	Glu	Cys	His	His	Arg	Tyr	Ala	Glu	Leu	Tyr	Val	Ile
			435				440						445		

Asp	Val	Asn	Ile	Asn	Ile	Ser	Cys	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr	Leu	Thr	Lys
450						455					460				
Met	Thr	Cys	Arg	Trp	Ser	Thr	Ser	Thr	Ile	Gln	Ser	Leu	Ala	Glu	Ser
465					470					475					480
Thr	Leu	Gln	Leu	Arg	Tyr	His	Arg	Ser	Ser	Leu	Tyr	Cys	Ser	Asp	Ile
				485					490					495	
Pro	Ser	Ile	His	Pro	Ile	Ser	Glu	Pro	Lys	Asp	Cys	Tyr	Leu	Gln	Ser
			500					505					510		
Asp	Gly	Phe	Tyr	Glu	Cys	Ile	Phe	Gln	Pro	Ile	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly
	515						520					525			
Tyr	Thr	Met	Trp	Ile	Arg	Ile	Asn	His	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Asp	Ser
	530					535					540				
Pro	Pro	Thr	Cys	Val	Leu	Pro	Asp	Ser	Val	Val	Lys	Pro	Leu	Pro	Pro
545					550					555					560
Ser	Ser	Val	Lys	Ala	Glu	Ile	Thr	Ile	Asn	Ile	Gly	Leu	Leu	Lys	Ile
				565					570					575	
Ser	Trp	Glu	Lys	Pro	Val	Phe	Pro	Glu	Asn	Asn	Leu	Gln	Phe	Gln	Ile
		580						585					590		
Arg	Tyr	Gly	Leu	Ser	Gly	Lys	Glu	Val	Gln	Trp	Lys	Met	Tyr	Glu	Val
		595					600					605			
Tyr	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Leu	Pro	Val	Pro	Asp	Leu	Cys
	610					615					620				
Ala	Val	Tyr	Ala	Val	Gln	Val	Arg	Cys	Lys	Arg	Leu	Asp	Gly	Leu	Gly
625					630					635					640
Tyr	Trp	Ser	Asn	Trp	Ser	Asn	Pro	Ala	Tyr	Thr	Val	Val	Met	Asp	Ile
			645						650					655	
Lys	Val	Pro	Met	Arg	Gly	Pro	Glu	Phe	Trp	Arg	Ile	Ile	Asn	Gly	Asp
			660					665					670		
Thr	Met	Lys	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Trp	Lys	Pro	Leu	Met
		675					680					685			
Lys	Asn	Asp	Ser	Leu	Cys	Ser	Val	Gln	Arg	Tyr	Val	Ile	Asn	His	His
	690					695					700				
Thr	Ser	Cys	Asn	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu	Asp	Val	Gly	Asn	His	Thr	Lys
705					710					715					720
Phe	Thr	Phe	Leu	Trp	Thr	Glu	Gln	Ala	His	Thr	Val	Thr	Val	Leu	Ala
			725						730					735	
Ile	Asn	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Phe	Ser
			740					745					750		
Trp	Pro	Met	Ser	Lys	Val	Asn	Ile	Val	Gln	Ser	Leu	Ser	Ala	Tyr	Pro
		755					760					765			

Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp
770 775 780

Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp
785 790 795 800

Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr
805 810 815

Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr
820 825 830

Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe
835 840 845

Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val
850 855 860

Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu
865 870 875 880

Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro
885 890 895

Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg
900 905 910

Thr Asp Ile Leu Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu
915 920 925

Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp
930 935 940

Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala
945 950 955 960

Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu
965 970 975

Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Val Gln
980 985 990

Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Arg Gln His Asp Phe Phe Lys
995 1000 1005

Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys
1010 1015 1020

Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp
1025 1030 1035 1040

Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp
1045 1050 1055

Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn
1060 1065 1070

Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe
1075 1080 1085

Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His

1090	1095	1100
Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp 105	1110	1115 1120
Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu 1125	1130	1135
Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile 1140	1145	1150
Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys 1155	1160	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Applicant(s): JOCKERS, et al.
Serial No.: 10/774,721
Filing Date: 2/9/2004
Docket No.: FRAV2003/0005 US NP
PRIOR ART